ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑ-ΠΑΙΔΙΟΥ

«Μοριακή επιδημιολογία κλινικών στελεχών *Staphylococcus aureus* στα παιδιά»

Μαρία Τσιριγωτάκη
MD, MSc, Παιδίατρος, Νεογνολόγος

Επιβλέπων: Εμμανουήλ Γαλανάκης, Καθηγητής Παιδιατρικής,
Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ηράκλειο
2023

UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOOL OF MEDICINE
DIVISION OF MOTHER & CHILD HEALTH

PhD Thesis:

"Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* clinical isolates in children"

Maria Tsirigotaki
MD, MSc, Paediatrician, Neonatologist

Supervisor: Emmanouil Galanakis, Professor of Paediatrics, Paediatric Infectious Diseases, School of Medicine, University of Crete, Greece

Heraklion
2023

CC BY-NC

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Εμμανουήλ Γαλανάκης, Καθηγητής Παιδιατρικής, Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Αχιλλέας Γκίκας, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας με εστιασμό στις Λοιμώξεις, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ευσταθία Σκούλικα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Βακτηριολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

Εμμανουήλ Γαλανάκης, Καθηγητής Παιδιατρικής, Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Αχιλλέας Γκίκας, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας με εστιασμό στις Λοιμώξεις, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ευσταθία Σκούλικα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Βακτηριολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Διαμαντής Κοφτερίδης, Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμωξιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ελένη Βεργαδή, Επίκουρος Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Χρυσούλα Περδικογιάννη, Επίκουρος Καθηγήτρια Παιδιατρικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ελευθερία Χατζηδάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Νεογνολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Στην οικογένειά μου…

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί μια πρωτότυπη μελέτη που στόχο της έχει να διαλευκάνει τη συνεχώς εξελισσόμενη επιδημιολογία των λοιμώξεων από χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο *(Staphylococcus aureus)*. Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα μικρόβιο το οποίο αποικίζει πολύ συχνά το ανώτερο αναπνευστικό και το δέρμα παιδιών και ενηλίκων και η συχνότητά του παρουσιάζει αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες. Με δεδομένο ότι η μοριακή επιδημιολογία των κλινικών στελεχών *Staphylococcus aureus* δεν είχε εξετασθεί στα παιδιά και στους εφήβους με σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις στην περιοχή μας, η διατριβή αυτή αποτέλεσε την αφορμή να εμβαθύνουμε περισσότερο στην επιδημιολογία των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων και να προσπαθήσουμε να ερμηνεύσουμε τη διασπορά στελεχών με ιδιαίτερα κλινικά χαρακτηριστικά και ιδιαίτερους φαινοτύπους αντοχής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότατες ευχαριστίες μου στον μέντορα μου κύριο Μανόλη Γαλανάκη, Καθηγητή Παιδιατρικής - Παιδιατρικών Λοιμώξεων στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την διατύπωση του ερευνητικού θέματος και για όλη τη βοήθεια και την υποστήριξή του από την αρχή έως και την ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες της διατριβής, κυρία Έφη Σκούλικα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Βακτηριολογίας στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και τον κύριο Αχιλλέα Γκίκα, Ομότιμο Καθηγητή Παθολογίας στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για όλη την πολύτιμη βοήθεια και για το χρόνο που διέθεσαν. Θερμές ευχαριστίες και στα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τις συμβουλές τους.

Θα ήθελα να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστήμιου Πατρών και υπεύθυνη του κέντρου αναφοράς για τον χρυσίζοντα σταφυλόκοκκο στην Ελλάδα, κυρία Ίριδα Σπηλιοπούλου και τον εξαίρετο συνεργάτη της κύριο Νίκο Γιορμέζη για την πολύτιμη βοήθειά τους στο πειραματικό μέρος της μελέτης μας και για όλη την υποστήριξή τους μέχρι σήμερα. Θερμές ευχαριστίες και στην διευθύντρια του Μικροβιολογικού εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου

κυρία Σοφία Μαράκη, που ήταν πάντα δίπλα μας όποτε τη χρειαστήκαμε. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Παιδιατρικών Λοιμώξεων (ESPID) για την υποτροφία ESPID Small Grant 2017, χωρίς την οποία δε θα ήταν εφικτή η εκπόνηση της μελέτης μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς μου και τον αδερφό μου για τη βοήθεια και την υποστήριξή τους σε κάθε βήμα μου ως τώρα καθώς και τους συνοδοιπόρους μου Μανόλη και Κωνσταντίνο που ήταν υπομονετικά δίπλα μου σε αυτό το ταξίδι.

Ηράκλειο, Μάρτιος 2023

Μαρία Τσιριγωτάκη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

		Σελίδα
	Περίληψη	10
	Abstract	14
	Συντομογραφίες	18
1.	**Εισαγωγή**	19
	1.1 S*taphylococcus aureus*	20
	1.2 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά	20
	1.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί	21
	1.3.1 Παράγοντες επιφανείας	21
	1.3.2 Τοξίνες	23
	1.3.3 Υπεραντιγόνα	26
	1.3.4 Ένζυμα	27
	1.3.5 Ανοσολογική απόκριση του ξενιστή	27
	1.4 Φορία και νόσος	28
	1.5 Κλινικές εκδηλώσεις νόσου	30
	1.5.1 Βακτηριαιμία	30
	1.5.2 Λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα	31
	1.5.3 Πνευμονία	32
	1.5.4 Λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων	33
	1.5.5 Μηνιγγίτιδα	34
	1.5.6 Σηπτική θρομβοφλεβίτιδα	35
	1.5.7 Λοιμώξεις του ουροποιητικού	35
	1.5.8 Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων	35
	1.5.9 Νόσοι διαμεσολαβούμενες από τοξίνη	37
	1.6 Μηχανισμοί αντοχής στα αντιμικροβιακά	39
	1.6.1 Β-λακταμικά αντιβιοτικά	40
	1.6.2 Γλυκοπεπτίδια	40
	1.6.3 Φθοριοκινολόνες	42
	1.6.4 Λινεζολίδη και δαπτομυκίνη	42

1.6.5 Αμινογλυκοσίδες 42
1.6.6 Φουσιδικό οξύ 43
1.6.7 Μουπιροσίνη 43
1.6.8 Τριμεθοπρίμη/Σουλφαμεθοξαζόλη 43
1.6.9 Τετρακυκλίνη 44
1.6.10 Μακρολίδες-Λινκοσαμίδες-Στρεπτογραμμίνη Β (MLSB) 44
1.7 Ανάδυση στελεχών ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη 46
1.7.1 Νοσοκομειακά στελέχη έναντι στελεχών κοινότητας MRSA 46
1.7.2 Επιδημιολογία στελεχών MRSA 47
1.8 Μέθοδοι μοριακού χαρακτηρισμού 49
2. Υλικά και Μέθοδοι 53
2.1 Συλλογή κλινικών στελεχών και ταξινόμηση 54
2.2 Ορισμοί 54
2.3 Συλλογή δεδομένων 54
2.4 Καλλιέργεια και ταυτοποίηση στελεχών *S. aureus* 55
2.5 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιμικροβιακά 55
2.6 Μοριακή διερεύνηση κλινικών στελεχών 55
2.6.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA 56
2.6.2 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) 56
2.6.3 Έλεγχος ποιότητας παραγόμενου DNA 58
2.6.4 Έλεγχος ύπαρξης γονιδίου αντοχής στη μεθικιλλίνη 60
2.6.5 Ανίχνευση των γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV* και *tst* 62
2.6.6 Ανίχνευση γονιδίων επιδερμολυτικών τοξινών (*eta,etb)* 64
2.6.7 Ανίχνευση των γονιδίων προσκολλητινών *(fnba, fnbB)* 65
2.7 Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 67
2.7.1 Απομόνωση DNA και εγκλεισμός σε δίσκους αγαρόζης 68
2.7.2 Πέψη με περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο 70

2.8 Πολυτοπική νουκλεοτιδική ανάλυση- Multi Locus Sequence Typing (MLST) 71

2.9 Στατιστική ανάλυση 72

3. Αποτελέσματα 74

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά 75

3.2 Κλινικές εκδηλώσεις 75

3.3 Έκβαση 77

3.4 Αντοχή στα αντιμικροβιακά 77

3.5 Επιδημιολογικά δεδομένα 79

3.5.1 Κλινικές εκδηλώσεις 79

3.5.2 Αντιμικροβιακές αντοχές 80

3.6 Μοριακά χαρακτηριστικά στελεχών *S. aureus* 84

3.6.1 Λοιμογόνα γονίδια 84

3.6.2 PFGE 86

3.6.3 MLST 86

3.6.4 Μοριακά χαρακτηριστικά στελεχών SSSS 90

4. Συζήτηση 91

Μελλοντικές προοπτικές 98

5. Παράρτημα 99

Υποτροφίες, δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις σχετιζόμενες με τη διδακτορική διατριβή

6. Βιβλιογραφία 102

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus, S. aureus*) είναι ένα συχνό παθογόνο που προκαλεί μεγάλο εύρος λοιμώξεων στον άνθρωπο. Ποσοστό 20% του γενικού πληθυσμού είναι φορείς του *S. aureus* και η φορία παρουσιάζει δικόρυφη κατανομή με υψηλά ποσοστά κατά τις πρώτες 8 εβδομάδες ζωής και κατά τη διάρκεια της εφηβείας.
Ο *S. aureus* αποτελεί το αίτιο πολλών διεισδυτικών και μη διεισδυτικών λοιμώξεων όπως είναι η βακτηριαιμία, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων και λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων καθώς και νόσων διαμεσολαβούμενων από τοξίνη. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναδυθεί και εξαπλωθεί στελέχη κοινότητας ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη (CA-MRSA) που προκαλούν επιδημίες λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων παγκοσμίως. Η αύξηση αυτή είναι πιο εμφανής σε μικρές ηλικίες και φαίνεται να σχετίζεται με την επικράτηση συγκεκριμένων κλώνων ανά γεωγραφική περιοχή. Επίσης πρόσφατα έχει περιγραφεί η αύξηση των περιπτώσεων σταφυλοκοκκικού συνδρόμου αποφολίδωσης του δέρματος (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS), μιας νόσου διαμεσολαβούμενης από τοξίνη που απαντάται σπάνια σε ενήλικες με υποκείμενα νοσήματα ή ανοσοκαταστολή ενώ είναι συχνή στα νεογνά και στα παιδιά. Υπεύθυνα είναι στελέχη *S. aureus* που παράγουν αποφολιδωτικές τοξίνες (ETA, ETB). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που έχουν προκαλέσει την αύξηση των λοιμώξεων από *S. aureus* και την επικράτηση συγκεκριμένων κλώνων όπως στελεχών CA-MRSA με λοιμογόνους παράγοντες όπως η λευκοκτονίνη Panton-Valentine (PVL) και η α-αιμολυσίνη.

Υλικά και μέθοδοι: Μελετήθηκαν παιδιά και έφηβοι κάτω των 18 ετών που νοσηλεύτηκαν λόγω λοίμωξης από *S. aureus* επιβεβαιωμένης με καλλιέργεια υλικού στα παιδιατρικά τμήματα και στις ειδικές μονάδες του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου από 1η Ιανουαρίου 2015 έως και 31 Δεκεμβρίου 2018. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν καλλιέργειες δερματικών βλαβών, πύου, υλικού παρακεντήσεων, αίματος, πτυέλων, βρογχικού εκπλύματος, εγκεφαλονωτιαίου υγρού καθώς και καλλιέργειες ρινικού επιχρίσματος σε περιπτώσεις νόσου διαμεσολαβούμενης από τοξίνη. Οι λοιμώξεις ταξινομήθηκαν με βάση το ιατρικό ιστορικό σε λοιμώξεις κοινότητας (Community-associated, CA), νοσοκομειακές λοιμώξεις (Hospital-associated, HA) και νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα (Community onset, Healthcare-Associated, COHA) και καταγράφηκαν οι κλινικές εκδηλώσεις, η διάρκεια νοσηλείας και η έκβασή τους. Για τις καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων ακολουθήθηκαν οι συμβατικές μέθοδοι. Η ταυτοποίηση των στελεχών *S. aureus* έγινε με βάση τη μορφολογία των αποικιών, τη χρώση Gram, τη δοκιμασία καταλάσης και πηκτάσης και με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek2 (bioMérieux, Marcy l' Etoile, France). Για τη ερμηνεία των αποτελεσμάτων ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια Clinical and

Laboratory Standards Institute (CLSI) του 2018. Για τον ποιοτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *S. aureus* ATCC 25923 και *S. aureus* ATCC 43300. Τα στελέχη ταξινομηθήκαν φαινοτυπικά σε ευαίσθητα στη μεθικιλλίνη (MSSA) ή ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη (MRSA) με βάση τη δοκιμασία διάχυσης δίσκων κεφοξιτίνης και τη δοκιμασία latex συγκόλλησης για την ανίχνευση της PBP2a (bioMerieux). Για την ανίχνευση της επαγώγιμης αντοχής στην κλινδαμυκίνη χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία D-test σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI. Η παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν την λευκοκτονίνη Panton–Valentine (*lukS/lukF-PV)*, του γονιδίου της τοξίνης του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας I (*tst)*, των γονιδίων των αποφολιδωτικών τοξινών *(eta, etb*) και των προσκολλητινών A και B (*fnbA,fnbB)* ελέγχθηκαν με PCR.

Ακολούθως τα στελέχη *S. aureus* τυποποιήθηκαν με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE). Τα αποτελέσματα της PFGE συσχετίσθηκαν και σχεδιάστηκε ένα δενδρόγραμμα συγκρίνοντας τα μοριακά βάρη των θραυσμάτων DNA μέσω του προγράμματος FPQuest (Bio-Rad). Στη μελέτη μας, πραγματοποιήθηκε πολυτοπική νουκλεοτιδική ανάλυση (Multi Locus Sequence Typing, MLST) σε αντιπροσωπευτικά στελέχη με βάση το φαινότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά και τους τύπους PFGE. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα eBURST (http://eburst.mlst.net) προκειμένου να καθοριστούν τα κλωνικά συμπλέγματα.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με την εφαρμογή των δοκιμασιών χ^2 ή two-tailed Fisher's exact test για τις κατηγορικές μεταβλητές και υπολογίστηκαν τα *p* values και odds ratios. Για τις συνεχείς μεταβλητές, η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε με τη χρήση της δοκιμασίας Mann–Whitney. Οι τάσεις σε ότι αφορά την αντοχή στα αντιμικροβιακά και στους τύπους κατά MLST αναλύθηκαν με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 chi square for trend. Το όριο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως *p* value <0.05. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού Graphpad version 9.1.0.

Αποτελέσματα: Κατά την διάρκεια της τετραετίας 2015 έως 2018, εντοπίσθηκαν 139 στελέχη χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου από παιδιά και εφήβους που νοσηλεύτηκαν με διεισδυτικές και μη διεισδυτικές λοιμώξεις στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 77 αγόρια και 62 κορίτσια. Η πλειοψηφία των στελεχών ήταν MSSA (123 στελέχη, 88.5%) και 16 ήταν MRSA (11.5%). Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν τα 3.8 έτη (διάμεσος 2.02 έτη). Ποσοστό 67.7% των στελεχών (94/136) απομονώθηκαν από λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων ενώ οι διεισδυτικές λοιμώξεις (22/139, 15.8%) και οι λοιμώξεις διαμεσολαβούμενες από τοξίνη (TMD) ήταν σπανιότερες (23/139, 16.5%). Τα περισσότερα στελέχη ανήκαν σε στελέχη κοινότητας (CA), ενώ τα νοσοκομειακά στελέχη και τα νοσοκομειακά στελέχη με έναρξη στην κοινότητα ήταν λιγότερο συχνά [CA (102/139, 73.4%), HA (20/139,14.4%) και COHA 17/139; 12.2%, αντίστοιχα]. Συνολικά 52 στελέχη ανήκαν σε παιδιά με χρόνια νοσήματα ή παρατεταμένη ενδονοσοκομειακή νοσηλεία. Η μέση διάρκεια νοσηλείας ήταν 7.5 ημέρες (1-70 ημέρες).

Παιδιά με λοιμώξεις από στελέχη MRSA δεν διέφεραν ως προς την διάρκεια νοσηλείας σε σχέση με MSSA στελέχη (p 0.87). Κατά το διάστημα παρακολούθησης δεν διαπιστώθηκαν θάνατοι.

Σε ότι αφορά τους φαινότυπους αντοχής, ποσοστό 93.5% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην πενικιλλίνη, 35.9% στο φουσιδικό οξύ, 7.2% στη μουπιροσίνη, 22.3% στην τομπραμυκίνη, 18.7% στην ερυθρομυκίνη, 16.5% στην κλινδαμυκίνη και 9.3% στην τετρακυκλίνη. Ανάμεσα στα 26 στελέχη που παρουσίαζαν αντοχή στην ερυθρομύκινη, ποσοστό 53.9%, 34.6%, και 11.5% αντίστοιχα παρουσίαζαν φαινότυπο αντοχής $cMLS_B$, $iMLS_B$ και MS αντίστοιχα. Τα στελέχη MRSA και MSSA δεν διέφεραν ως προς τους φαινοτύπους αντοχής $cMLS_B$ και $iMLS_B$ (OR 0.20, 95% CI 0.03-1.39, p 0.16). Κανένα στέλεχος δεν παρουσίαζε αντοχή στην βανκομυκίνη, ριφαμπικίνη, λινεζολίδη και τεϊκοπλανίνη. Όλα τα στελέχη που ήταν φαινοτυπικά ανθεκτικά στην κεφοξιτίνη, ήταν επίσης ανθεκτικά στην οξακιλλίνη και έφεραν το γονίδιο *mecA*.

Κατά την διάρκεια μελέτης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων από στελέχη MSSA [OR 3.32 95%CI (1.18-8.96) p 0.03, x^2 5.56 df:1, p 0.02] καθώς και στατιστικά σημαντική αύξηση των περιπτώσεων SSSS (x^2 for trend 5.36, df1, p 0.02). Παράλληλα, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της αντοχής σε φουσιδικό οξύ και μουπιροσίνη (φουσιδικό οξύ, x^2 test for trend, p 0.01; μουπιροσίνη x^2 test for trend, p <0.0001). Οι αυξητικές τάσεις της αντοχής της μουπιροσίνης συσχετίσθηκαν με αύξηση των ανθεκτικών στη μουπιροσίνη στελεχών MSSA (p <0.0001). Όλα τα στελέχη (N=139) εξετάστηκαν για την ύπαρξη λοιμογόνων γονιδίων. Από αυτά, 13 στελέχη (9.4%) ήταν *lukS/lukF-PV* θετικά, 27 (19.4%) *eta* θετικά, έξι (4.3%) *etb* θετικά, 13 (9.4%) *tst* θετικά, 125 (89.9%) *fnbA* θετικά και 21 (15.1%) *fnbB* θετικά. Τα στελέχη MRSA παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά γονιδίων *lukS/lukF-PV και tst* σε σύγκριση με τα MSSA ενώ τα MSSA είχαν υψηλότερα ποσοστά γονιδίων *eta* (Πίνακας 8). Τα στελέχη MSSA παρουσίασαν πολυκλονικότητα κατά PFGE και ταξινομήθηκαν σε 20 τύπους κάθε ένας από τους όποιους περιελάμβανε 1 έως 40 στελέχη. Ανιχνεύτηκαν δυο κυριάρχοι τύποι, ο τύπος 1 με 10 υποτύπους (ST121) που περιελάμβανε 40 στελέχη και ο τύπος 2 με 7 υποτύπους και 16 στελέχη. Συνολικά, 16 PFGE τύποι συμπεριέλαβαν ένα έως 8 στελέχη MSSA ο καθένας. Επιπλέον, δύο στελέχη MSSA ταξινομήθηκαν στους PFGE τύπους C (ST80) και H (ST225). Τα στελέχη MRSA ανήκαν σε 4 τύπους: στον τύπο A ανήκαν 4 στελέχη (ST30), στον τύπο B: 4 στελέχη (ST239), στον τύπο C: 5 στελέχη (ST80) και στον τύπο H: 3 στελέχη (ST225). Κατά MLST μελετήθηκαν 58 αντιπροσωπευτικά στελέχη εκ των οποίων όλα τα στελέχη απομονώθηκαν από παιδιά με λοιμώξεις διαμεσολαβούμενες από τοξίνη (SSSS). Ανάμεσα στα στελέχη που απομονώθηκαν από SSSS, ο τύπος PFGE 1, ST121 ήταν ο κυρίαρχος τύπος (13/23, 56.5%, p 0.002).

Στη μελέτη μας, 40 στελέχη ανήκαν στον τύπο ST121, εκ των οποίων όλα ήταν MSSA και παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα αντοχής στο φουσιδικό οξύ (80%), στην τομπραμυκίνη (35%), μουπιροσίνη (25%) και στην κλινδαμυκίνη (25%), σπανίως έφεραν γονίδια PVL και *tst* (3/40

και 0/40 αντίστοιχα) αλλά ήταν θετικά για γονίδια *eta* ή/και *etb* (*eta* 27/40, *etb* 6/40, *eta* και *etb* 4/40) καθώς και γονίδια που επιτρέπουν την προσκόλληση στο επιθήλιο (*fnbA* 40/40). Ο τύπος PFGE 1 προκαλούσε κυρίως SSTIs (26/40) και SSSS (13/40) ενώ καταγράφηκε μία περίπτωση διεισδυτικής νόσου. Συγκριτικά με τους άλλους τύπους, η αντοχή στη μουπιροσίνη και η παρουσία των γονιδίων *eta/etb* ήταν αποκλειστικά συνδεδεμένη με τον τύπο 1 ($p<0.0001$).

Συμπεράσματα: Ο CA-MSSA είναι το κύριο αίτιο λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων καθώς και σταφυλοκοκκικού συνδρόμου αποφολίδωσης δέρματος στα παιδιά και στους εφήβους στην περιοχή μελέτης. Ο κλώνος ST121, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα αντοχής στο φουσιδικό οξύ και στη μουπιροσίνη είναι ο κυρίαρχος ανάμεσα στα στελέχη που προκαλούν SSSS. Η γνώση των φαινοτυπικών, των μοριακών χαρακτηριστικών καθώς και της επιδημιολογίας των στελεχών *S. aureus* μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες στην κλινική πρακτική ενώ ο χαρακτηρισμός του γενετικού τους υποβάθρου μπορεί να ερμηνεύσει τις τρέχουσες αλλαγές που παρατηρούνται στην επιδημιολογία και στις κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από *S. aureus.*

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* infections cause significant morbidity and mortality in children and adolescents. There is limited data on the characteristics of *S. aureus* infections requiring hospitalization in childhood. Aim of this study was to investigate the molecular epidemiology and antibiotic resistance of *S. aureus* clinical isolates from children and adolescents.

Methodology: This cohort study included all *S. aureus* isolates recovered from children and adolescents younger than 18 years who were admitted to the University Hospital of Heraklion, Crete from 1 January 2015 to 31 December 2018. Medical records were reviewed for demographic and clinical characteristics. Infections were classified into (I) skin and soft tissue infections (SSTIs) such as impetigo, cellulitis, abscess, omphalitis, (II) toxin-mediated disease (TMD) including staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome and (III) invasive disease (INV) including septicaemia, pneumonia, osteomyelitis, and septic arthritis. Infections with positive cultures obtained from normally sterile fluids, including CSF, blood and synovial fluid were considered invasive infections. Infections and the recovered isolates were classified as community-associated (CA), community-onset healthcare-associated (COHA) and hospital-associated (HA) based on established CDC criteria. To examine possible changes over time, we studied subsets of isolates collected during two periods: 2015–2016 (period A) and 2017–2018 (period B).

The isolates were identified by conventional methods, including colony morphology, Gram staining, standard biochemical tests and by the automated Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy l' Etoile, France). Antimicrobial susceptibilities were interpreted according to the 2018 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria. *S. aureus* ATCC 25923 and S. aureus ATCC 43300 were used as control strains. Isolates were phenotypically classified as methicillin susceptible *S. aureus* (MSSA) or MRSA based on the cefoxitin disc diffusion test and the latex agglutination test for the detection of PBP2a (bioMerieux). Inducible resistance to clindamycin was tested by d-test as per CLSI guidelines. *S. aureus* isolates that were resistant to cefoxitin were phenotypically classified as MRSA and verified by PCR for *mecA* or *mecC* gene carriage. Genes encoding Panton–Valentine leukocidin *(lukS/lukF-PV*), toxic

shock syndrome toxin-I *(tst)*, exfoliative toxins (eta, etb), fibronectin binding proteins A and B (*fnbA*, *fnbB*) were investigated by polymerase chain reactions with specific primers. Isolates were classified into main pulsotypes and subtypes by PFGE of chromosomal DNA SmaI digests performed in a CHEF DR III apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). A dendrogram comparing molecular weights of strains' DNA fragments was performed by FPQuest software version 4.5. (Bio-Rad Laboratories). Representative isolates of the main PFGE types, including all MRSA and selected MSSA isolates, were further characterized by MLST to sequence types (STs), based on the online MLST database (https://pubmlst.org/organisms/ staphylococcus-aureus). Statistical analysis for categorical variables, chi-square or two-tailed Fisher's exact test were conducted to calculate p values and odds ratios. For continuous variables, statistical significance of observed associations was evaluated using Mann–Whitney U-test. Antibiotic susceptibility trends and MLST trends were analysed using chi-square for trend. The level of significance was set at p value less than 0.05. Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 9.1.0.

Results: During the 4-year study period, 139 non-duplicated *S. aureus* isolates were collected from children and adolescents (77 boys, 62 girls) with invasive and non-invasive infections. Sixteen (11.5%) isolates were MRSA and 123 (88.5%) were MSSA. The mean age of patients was 3.8 years (median age; 2.02 years) and it did not differ between children with MSSA and those with MRSA. *S. aureus* isolates were derived most frequently from skin and soft tissue infections (SSTIs; 94/139, 67.6%), followed by toxin-mediated disease (TMD; 23/139,16.5%, all 23 cases were SSSS) and invasive infections (INV; 22/139,15.8%). Pneumonia (9/22), bacteraemia (4/22) and osteoarticular infections (6/22) were the most common invasive *S. aureus* infections. MRSA isolates did not differ with regards to gender, length of stay, infection type, PICU admission as compared to MSSA and there was no associated mortality. All isolates recovered from children with TMD were MSSA. Most isolates were classified as CA (102/139; 73.4%), while HA and COHA were less common (20/139;14.4% and 17/139; 12.2%, respectively). A total of 52 isolates belonged to children with comorbidities or prolonged hospital-stay, including neonates (38 isolates), children with cystic fibrosis (seven

isolates), children admitted to PICU (six isolates) and one child with malignancy. HA and COHA-isolates were more commonly isolated from these children (OR 2.8, 95%CI 1.27–5.78, p 0.01) and were more commonly associated with invasive disease (OR 4.41, 95%CI 1.71–10.79, p 0.001). Of 139 *S. aureus* isolates, 93.5% were resistant to penicillin, 35.9% to fusidic acid, 7.2% to mupirocin, 22.3% to tobramycin, 18.7% to erythromycin, 16.5% to clindamycin and 9.3% to tetracycline. Among 26 erythromycin-resistant isolates, prevalence of constitutive (cMLSB), inducible (iMLSB) and MS resistance phenotypes was 53.9, 34.6 and 11.5%, respectively. Resistance to clindamycin and tetracycline was higher among MRSA isolates (p 0.02 and p 0.001, respectively). MRSA and MSSA isolates did not differ regarding cMLSB and iMLSB resistance phenotype (OR 0.20, 95%CI 0.03–1.39, p 0.16). None of the *S. aureus* isolates were resistant to vancomycin, rifampicin, linezolid or teicoplanin. All phenotypically cefoxitin-resistant isolates were also oxacillin-resistant, carrying mecA and were characterized as MRSA. Fusidic acid resistance was more common in isolates derived from SSTI and TMD infections (OR 7.2, 95%CI 2.42–20.3, p 0.0002). We did not observe significant differences in methicillin resistance among CA and HA isolates (OR 2.78, 95%CI 0.66–12.79, p 0.17). CA-isolates were highly resistant to penicillin compared to healthcare-associated isolates (OR 75.2, 95%CI 22.7–223.4, p <0.0001) and they did not differ regarding resistance to other antimicrobials.

Methicillin resistance declined significantly from 18.3% in period A to 6.3% in period B (p 0.03). A significant increase in fusidic acid and mupirocin resistance was observed (fusidic acid resistance x^2 test for trend, P 0.01; mupirocin resistance x^2 test for trend, p <0.0001).

All 139 isolates were tested for virulence genes; 13 isolates (9.4%) harboured *lukS/lukF-PV*, 27 (19.4%) *eta*, six (4.3%) *etb*, 13(9.4%) *tst*, 125 (89.9%) *fnbA* and 21 (15.1%) *fnbB* genes. MRSA showed higher detection rates of *lukS/lukF-PV and tst* genes as compared to MSSA isolates and MSSA showed higher rates of eta gene carriage. Detection rates of *eta* gene was also higher among isolates derived from TMD as compared to those causing INV/ SSTIs (OR 3.5, 95%CI 1.36–9.29, p 0.01). MSSA isolates showed polyclonality by PFGE and were classified into 20 pulsotypes including one to 40 strains each. However, two predominant pulsotypes were identified: type 1 with ten subtypes (ST121) including 40 strains and type 2

with seven subtypes and 16 strains. Sixteen PFGE types included one to eight MSSA strains each. Two additional MSSA were classified to PFGE types C (ST80) and H (ST225). MRSA belonged to four pulsotypes; type A: four strains (ST30), B: four strains (ST239), C: five strains (ST80) and H: three strains (ST225). Multilocus sequence typing identified five sequence types among the 58 tested isolates. All 23 isolates from children with SSSS were characterized by MLST. Pulsotype 1, ST121 was predominant (13/23, 56.5%, p 0.002). Of 23 SSSS isolates, nine isolates (39.1%) were shown to carry *eta* gene, three (13%) carried *etb*, one isolate (4.3%) carried both eta and etb. Isolates harbouring *eta or etb* genes all belonged to PFGE type1, ST121. In our study, 40 isolates belonged to ST121, all of them were MSSA and CA in their majority (31/40, 77.5%). As compared to other isolates, ST121 was highly resistant to fusidic acid (80%), tobramycin (35%), mupirocin (25%) and clindamycin (25%), rarely carried PVL and tst genes (3/40 and 0/40, respectively) but harboured epidermolysin genes (*eta* 27/40; *etb* 6/40; both *eta and etb* 4/40) and genes facilitating adherence to the epithelium (*fnbA* 40/40) and causing mainly SSTIs (26/40), SSSS (13/40) and one case of invasive disease. Compared to other pulsotypes, mupirocin resistance and presence of eta/etb genes was exclusively linked to pulsotype 1 ($p < 0.0001$).

Conclusion: In our population, community-associated MSSA was the predominant cause of *S. aureus* infections characterized by polyclonality, increasing resistance to fusidic acid and mupirocin. PFGE type 1 ST121 clone, harboured exfoliative toxins genes and was associated with rising trends of SSSS.

Συντομογραφίες

eta: γονίδιο της επιδερμολυσίνης ETA

etb: γονίδιο της επιδερμολυσίνης ETB

fnbA: γονίδιο της προσκολλητίνης A

fnbB: γονίδιο της προσκολλητίνης B

lukS-PV/lukF-PVL: γονίδια της λευκοκτονίνης Panton-Valentine

MRSA: Ανθεκτικός στη μεθικιλλίνη *Staphylococcus aureus*

MSSA: Ευαίσθητος στη μεθικιλλίνη *Staphylococcus aureus*

PBP*s:* πενικιλλινο- δεσμευτικές πρωτεΐνες

PVL: Panton- Valentine λευκοκτονίνη

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SSTI: Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων

TMD: Λοίμωξη διαμεσολαβούμενη από τοξίνη

Tst: γονίδιο της τοξίνης του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας

TSST-1: τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Staphylococcus aureus

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus, S. aureus*) είναι ένα από τα πιο συχνά παθογόνα βακτήρια στον άνθρωπο το οποίο σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα (1) . Ο *S. aureus* είναι συμβιωτικός μικροοργανισμός που αποικίζει αρκετά είδη ζώων και τον άνθρωπο. Οι ρινικές κοιλότητες και η επιφάνεια του δέρματος αποτελούν τα κύρια σημεία αποικισμού του στον άνθρωπο (2,3). Μπορεί να προκαλέσει μια μεγάλη ποικιλία λοιμώξεων που περιλαμβάνουν επιφανειακές λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων όπως αποστήματα, δοθιήνες αλλά και πιο σοβαρές συστηματικές λοιμώξεις όπως βακτηριαιμία, ενδοκαρδίτιδα, πνευμονία και νόσους διαμεσολαβούμενες από τοξίνη όπως το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας και το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο αποφολίδωσης του δέρματος (4–6).

1.2 **Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά**

Ο όρος Staphylococcus προέρχεται ετυμολογικά από την ελληνική λέξη σταφύλι λόγω των δίκην τσαμπιών σταφυλιών σχηματισμών που παρουσιάζουν τα βακτήρια. Πρόκειται για Gram θετικούς κόκκους, διαμέτρου 0.5 έως 1.5 μm οι οποίοι αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και δίνουν θετική τη δοκιμασία καταλάσης. Η καταλάση διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε οξυγόνο και νερό. Είναι ακίνητοι και μη σπορογόνοι, δυνητικά αναερόβιοι και διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα αποτελούμενο από πεπτιδογλυκάνη, τειχοϊκό οξύ και πρωτεΐνες.

Εικόνα 1.2 Καλλιέργεια *S. aureus.*

1.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί

Οι παράγοντες που συμβάλουν στη λοιμογόνο δράση του *S. aureus* είναι παράγοντες επιφανείας του κυττάρου, τοξίνες και ένζυμα.

1.3.1 Παράγοντες επιφανείας

Έλυτρο: Το εξωτερικό στρώμα του σταφυλοκοκκικού κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να καλύπτεται από ένα πολυσακχαριδικό έλυτρο. Το έλυτρο αναστέλλει τη χημειοταξία και τη φαγοκυττάρωση και εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των μονοπύρηνων κυττάρων.

Πεπτιδογλυκάνη και τειχοϊκά οξέα: Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος και αποτελείται από τα αμινοσάκχαρα Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη και Ν-ακετυλομουραμικό οξύ που συνδέονται μεταξύ τους με τον 1,4 β-γλυκοσιδικό δεσμό. Η πεπτιδογλυκάνη προσδίδει τη σταθερότητα του τοιχώματος του σταφυλοκόκκου και παίζει επίσης ρόλο στην παθογόνο δράση καθώς προκαλεί την παραγωγή ιντερλευκίνης-1 από τα φαγοκύτταρα και συμβάλει στη στρατολόγηση πολυμορφοπυρήνων στο σημείο της φλεγμονής (7). Τα τειχοϊκά οξέα είναι πολυμερή ειδικά του είδους και στον *S. aureus* αποτελούνται από ριβιτόλη με ομάδες Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης, που συνδέονται με την πεπτιδογλυκάνη ή με την κυτταροπλασματική μεμβράνη δια μέσου λιπόφιλων ομάδων (λιποτειχοϊκά οξέα). Βασικός τους ρόλος είναι η σύνδεση με την φιμπρονεκτίνη και η προαγωγή της προσκόλλησης του βακτηρίου στους βλεννογόνους του ξενιστή (8). Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες του *S. aureus* περιλαμβάνουν τις πενικιλλίνη-δεσμευτικές πρωτεΐνες (Penicillin Binding Proteins -PBPs) οι οποίες συμμετέχουν στο τελικό στάδιο της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης και αποτελούν τον μοριακό στόχο των β-λακταμών και την πρωτεΐνη Α (9,10).

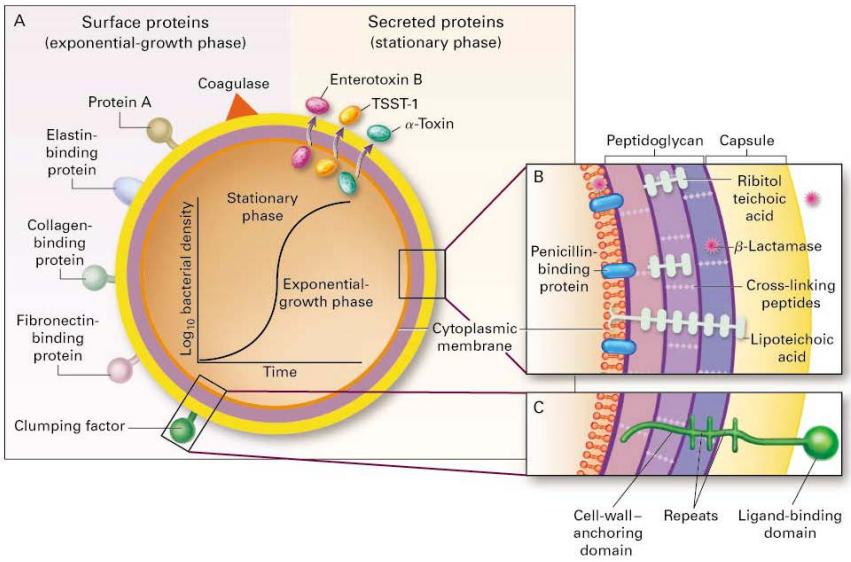
Ο *Staphylococcus aureus* επιτυγχάνει την προσκόλλησή του μέσω μορίων προσκόλλησης (MSCRAMMs, microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) τα οποία συνδέονται με την εξωκυττάρια διάμεση ουσία.

Πρωτεΐνες που δεσμεύουν την φιμπρονεκτίνη (FnbA,FnbB)

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν τη φιμπρονεκτίνη FnbA, FnbB (Fibronectin-binding protein A,B) ανήκουν στην οικογένεια των MSCRAMMs και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *fnbA* και *fnbB*. Βοηθούν στην προσκόλληση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και στην είσοδο του μικροβίου στα κύτταρα του ξενιστή. Σε ότι αφορά την παθογένεια των λοιμώξεων, συμμετέχουν στην επαγωγή της φλεγμονώδους αντίδρασης (11).

Πρωτεΐνη Α: Η πρωτεΐνη Α, μοριακού βάρους 42kDa, έχει την ιδιότητα να συνδέεται με το Fc τμήμα της ανοσοσφαιρίνης IgG και να έχει ανοσορρυθμιστικές δράσεις (8). Έτσι, ο μικροοργανισμός προσκολλάται στα αντισώματα με τέτοιον προσανατολισμό που δεν προκαλεί την ενεργοποίησή τους με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η φαγοκυττάρωση. Η ιδιότητα αυτή έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές στην εργαστηριακή διάγνωση των κλινικών δειγμάτων *S. aureus*. Έχει επίσης την ικανότητα σύνδεσης με το Fab τμήμα των αντισωμάτων προξενώντας πολυκλωνική διέγερση, παρόμοια με αυτή των υπεραντιγόνων και οδηγώντας σε απόκριση τύπου Th1 (12).

Εικόνα 1.3.1. Δομή του *S. aureus.*



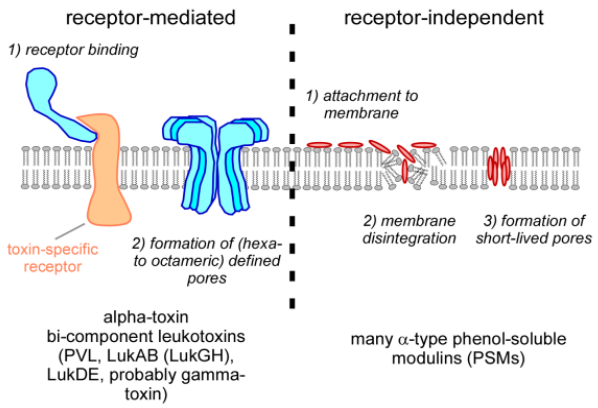
(Πηγή: Lowly F, *Staphylococcus aureus* infections, NEJM 1998)

1.3.2 Τοξίνες

Ο *S. aureus* παράγει μεγάλη ποικιλία τοξινών, που ευθύνονται για τις κλινικές εκδηλώσεις νόσου. Αυτές είναι οι εξωτοξίνες (αιμολυσίνες) α, β, γ, δ και οι λευκοκτονίνες, η οικογένεια των υπεραντιγόνων, που περιλαμβάνει την τοξίνη του συνδρόμου τοξικής καταπληξίας (Toxic Shock Syndrome-1, TSST-1), τις εντεροτοξίνες (SEA-E και SEG-O) και τις επιδερμολυτικές τοξίνες (ETA, B, C, D). Στην παρούσα εργασία, ασχοληθήκαμε με τη λευκοκτονίνη Panton-Valentine (PVL), την TSST-1 και τις επιδερμολυσίνες (ETA,ETB).

Οι τοξίνες που προκαλούν λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων χαρακτηρίζονται αιμολυσίνες ενώ εκείνες που στοχεύουν τα λευκά αιμοσφαίρια, λευκοτοξίνες (4). Ανάλογα με το εάν απαιτείται πρόσδεση σε υποδοχέα ή όχι, οι τοξίνες διακρίνονται σε διαμεσολαβούμενες και μη διαμεσολαβούμενες από υποδοχέα [Εικόνα 1.2.2]. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι α-αιμολυσίνη, PVL, LukAB (LukGH), LukDE και πιθανά και η γ-αιμολυσίνη.

Εικόνα 1.2.2 Ταξινόμηση των τοξινών ανάλογα με τη διαμεσολάβηση ή όχι υποδοχέα.



Πηγή: Otto et al, 2014 (13)

Αιμολυσίνες

Η α-αιμολυσίνη είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη τοξίνη του *S. aureus* (14). Έχει μήκος 293 αμινοξέα, κωδικοποιείται από το γονίδιο *hla* και εκφράζεται σαν μονομερές που προσδένεται στη μεμβράνη των κυττάρων-στόχου του ξενιστή μέσω του υποδοχέα ADAM10 (15,16). Οι υποομάδες της σχηματίζουν επταμερείς δακτυλίους με κεντρικό πόρο που επιτρέπουν την απώλεια μονοσθενών και δισθενών ιόντων με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου. Στον

άνθρωπο τα αιμοπετάλια και τα μονοκύτταρα είναι ευαίσθητα στην α-αιμολυσίνη καθώς έχουν υποδοχείς υψηλής συνάφειας για την τοξίνη αυτή. Η πρόσδεση της τοξίνης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση εικοσανοειδών και κυτταροκινών που επάγουν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Αυτά εξηγούν τη βαριά εικόνα του σηπτικού σοκ που εμφανίζεται σε σοβαρές λοιμώξεις από *S. aureus* (17).

Ο ρόλος της α-αιμολυσίνης ως λοιμογόνου παράγοντα στην παθογένεια των λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων έχει περιγραφεί περίπου εδώ και έναν αιώνα (14). Πειράματα σε ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι πειραματόζωα αρνητικά ως προς υποδοχέα ADAM10 προστατεύονταν από σοβαρές δερματικές λοιμώξεις. Ενώ από επιδημιολογικές μελέτες παρατήρησης φάνηκε ότι MRSA στελέχη με υψηλά επίπεδα α-αιμολυσίνης συσχετίζονται με βαρύτερη νόσο (14,14,18,19).

Η β- αιμολυσίνη είναι μια σφιγγομυελινάση που προκαλεί καταστροφή των πλούσιων σε λιπίδια μεμβρανών και οδηγεί σε λύση των κυττάρων. Παράγεται από πολλά στελέχη *S. aureus* και κωδικοποιείται από το γονίδιο *hlb*. Τα περισσότερα στελέχη που προσβάλλουν τον άνθρωπο δεν εκφράζουν την β-αιμολυσίνη (17).

Η αιμολυσίνη γ ανήκει σε μια ομάδα τοξινών μαζί με τις λευκοκτονίνες οι οποίες αποτελούνται από δύο υποομάδες, την S (Slow-eluting) και την F (Fast-eluting) και κωδικοποιείται από τα γονίδια hlg.

Το 2007, ανακαλύφθηκε ότι η δ-αιμολυσίνη ανήκει στην οικογένεια των διαλυτών στη φαινόλη μοντουλινών (PSM). Οι PSM είναι μικρά, αμφιπαθητικά, κυτταροτοξικά πεπτίδια που προκαλούν λύση στα ανθρώπινα κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των ουδετεροφίλων και ερυθροκυττάρων και έχουν πολλαπλές δράσεις στην παθογένεια των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων (14) και δεν απαιτούν τη σύνδεση με κάποιο μεμβρανικό υποδοχέα αλλά μπορούν να διαπερνούν τη μεμβράνη παθητικά. Όπως συμβαίνει και με την α-αιμολυσίνη, οι PSMs παράγονται από τα περισσότερα στελέχη *S. aureus* (14,20). Πρόσφατα στα πεπτίδια PSMa αποδόθηκε ο ρόλος των τοξινών που συμμετέχουν στη λύση των ουδετεροφίλων μετά τη φαγοκυττάρωση (21–23). Η λύση μετά τη φαγοκυττάρωση μπορεί να ερμηνεύσει εν μέρει γιατί απέτυχε η ανάπτυξη εμβολίων έναντι του *S. aureus* που στηρίχθηκαν στην οψωνοφαγοκυττάρωση (24). Δεδομένα από in vivo και in vitro μελέτες δείχνουν ότι οι PSMs

έχουν πιθανά σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων καθώς αυτές και τα προϊόντα τους διευκολύνουν τον αποικισμό και τη διασπορά του *S. aureus* στο δέρμα (13). Μάλιστα η απώλεια των PSM σε πειραματικά ζωικά μοντέλα οδήγησε σε σημαντική μείωση των δερματικών βλαβών (14,25) ενώ τα επίπεδα των PSM ήταν υψηλότερα σε κλινικά στελέχη MRSA που απομονώθηκαν από λοιμώξεις δέρματος όταν συγκρίθηκαν με στελέχη πνευμονίας ή λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας (25).

Λευκοκτονίνες

Στις λευκοκτονίνες ανήκουν η λευκοκτονίνη PVL (Panton-Valentine, γονίδια LukS-PV και lukF-PV), η LukE/D (γονίδια l*ukE* και *lukD*) και η *lukM/F'-PV like* (γονίδια lukM και lukF'). Γονίδια λευκοκτονινών έχουν βρεθεί σε στελέχη *S. aureus* που προκαλούν λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων, νεκρωτική πνευμονία

Τοξίνη PVL

Η λευκοκτονίνη PVL προκαλεί λύση στα λευκά αιμοσφαίρια του ανθρώπου και από τις αρχές του 1990 συνδέθηκε με τις δερματικές λοιμώξεις από *S. aureus* (26,27). Ο μηχανισμός δράσης της PVL στηρίζεται στην προσκόλληση στην κυτταρική μεμβράνη των υπομονάδων S και F με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης και την είσοδο ιόντων. Με τον τρόπο αυτόν επάγει την έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων από τα πολυμορφοπύρηνα και έχει τοξική δράση για πολυμορφοπύρηνα, μονοκύτταρα και μακροφάγα.

Επιδημιολογικά η PVL συσχετίσθηκε με λοιμώξεις CA-MRSA ενώ γέννησε το ερώτημα κατά πόσον η παρουσία της συνδέεται με αυξημένη επιθετικότητα των στελεχών (14,14,28). Δεδομένα από μεταναλύσεις πολλών μελετών έχουν δείξει ότι η παρουσία της PVL σχετίζεται με τη δημιουργία αποστημάτων και δοθιήνων με λόγο αναλογιών 10.5 (95% CI, 7.4 to 14.9) (14,14,14,14). Παρόλα αυτά, η ποσότητα της PVL δε φαίνεται να συσχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου. Για παράδειγμα, στελέχη με υψηλή παραγωγή PVL έχουν απομονωθεί από ασθενείς με μη επιπλεγμένα αποστήματα ενώ ασθενείς που εμφάνισαν νεκρωτική φασιίτιδα έφεραν στελέχη *S. aureus* με χαμηλότερη παραγωγή PVL (14,29).

Ομοίως, σε ζωικά μοντέλα, PVL αρνητικά στελέχη προκαλούσαν SSTIs όμοιες με εκείνες των PVL θετικών στελεχών. (14,30).

Επιδερμολυτικές τοξίνες

Οι επιδερμολυτικές τοξίνες (ETA, ETB) είναι πρωτεάσες σερίνης και επιδρούν στις επιφανειακές στιβάδες του δέρματος (31) και διασπούν τη δεσμογλεϊνη-1 που σχηματίζει γέφυρες στην κοκκώδη στιβάδα της επιδερμίδας. Η ETA κωδικοποίειται από το χρωμοσωμικό γονίδιο *eta* και η ETB από το πλασμιδιακό γονίδιο *etb*. Προκαλούν το σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό δερματικό σύνδρομο, μια σοβαρή δερματική νόσο που εκδηλώνεται με εξάνθημα και σοβαρή απολέπιση του δέρματος.

1.3.3 Υπεραντιγόνα

Ο S aureus εκφράζει δύο διαφορετικά είδη τοξινών με δράση υπεραντιγόνου, τις εντεροτοξίνες [6 ορότυποι (A, B, C, D, E και G)] και την τοξίνη του συνδρόμου τοξικού σοκ (TSST-1). Τα υπεραντιγόνα ενεργοποιούν τα Τ-κύτταρα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων κυτταροκινών καθώς δεσμεύονται απευθείας στα τάξης ΙΙ μείζονα συμπλέγματα ιστοσυμβατότητας των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων.

Οι εντεροτοξίνες (20-30Kd) προκαλούν συμπτώματα από το γαστρεντερικό όπως εμετό και διαρροϊκές κενώσεις και ευθύνονται για τις τροφικές δηλητηριάσεις από *S. aureus*. Πρόκειται για μόρια που κινητοποιούν την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων. Ο μηχανισμός δράσης των εντεροτοξινών δεν είναι πλήρως γνωστός και περιλαμβάνει την απελευθέρωση κυτταροκινών που προκαλούν κυτταρικό θάνατο και απόπτωση. Οι εντεροτοξίνες Β (SEB) και C (SEC) ευθύνονται για το 50% των περιπτώσεων μη εμμηνορησιακού συνδρόμου τοξικού σοκ (TSS)(17).

Το πιο ευρέως γνωστό υπεραντιγόνο του *S. aureus* είναι η τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας (TSST, 22 kD, γονίδιο *tst*). Δρα διεγείροντας την απελευθέρωση IL-1, IL-2, TNF-α και άλλων κυτταροκινών και προκαλεί το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας (TSS). Σε αντίθεση με τις εντεροτοξίνες, η τοξίνη αυτή δεν έχει επίδραση στο γαστρεντερικό

σύστημα και ευθύνεται για το 75% όλων των TSS. Με εξαίρεση την εντεροτοξίνη IX που παράγεται στο 95% των στελεχών, όλες οι εντεροτοξίνες και η TSST είναι παρούσες σε μικρό αριθμό στελεχών *S. aureus* (32).

1.3.4 Ένζυμα

Ο *S. aureus* διαθέτει πολλά ένζυμε με τα οποία παρεμβαίνει στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή (4). Πολλά από αυτά είναι πρωτεάσες όπως πρωτεάσες σερίνης, πηκτάση, κολλαγονάση, σταφυλοκινάση, λιπάση, δεοξυριβονουκλεάση, μετατρεπτικό ένζυμο λιπαρών οξέων (FAME) (33,34) με τις οποίες επιτυγχάνει αναστολή της φαγοκυττάρωσης, δημιουργία αποστημάτων και προσκόλληση σε καθετήρες και προσθετικά υλικά (35,36).

Σημαντικό παθογενετικό ρόλο έχουν η καταλάση η οποία διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε O_2 και H_2O και περιορίζει την αντιμικροβιακή ικανότητα των ουδετερόφιλων του ξενιστή καθώς και η πηκτάση (ελεύθερη και συνδεδεμένη) η οποία καταλύει την μετατροπή του ινωδογόνου σε ινική. Παράγει επίσης υαλουρονιδάση και άλλα ένζυμα όπως πρωτεϊνάσες, νουκλεάσες και λιπάσες που εξασφαλίζουν ωσμωτική σταθερότητα, διεγείρουν την παραγωγή ενδογενών πυρετογόνων, έλκουν τα λευκοκύτταρα και αναστέλλουν τη φαγοκυττάρωση.

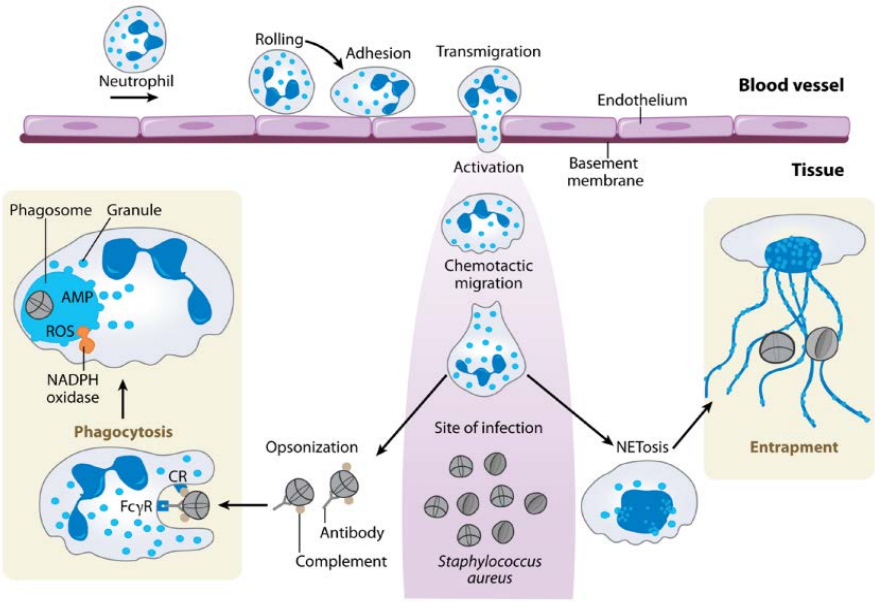
1.3.5 Ανοσολογική απόκριση του ξενιστή

Η φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι του *S. aureus.* Τα ουδετερόφιλα παίζουν σημαντικό λόγο ως κύτταρα φαγοκυττάρωσης στην άμυνα του ξενιστή έναντι των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Ένα φυσιολογικό, διαμεσολαβούμενο από ουδετερόφιλα σύστημα φαγοκυττάρωσης έχει καίρια θέση στην εξουδετέρωση των στελεχών *S. aureus* (1,37). Για το λόγο αυτό, παιδιά με συγγενείς ανεπάρκειες των ουδετεροφίλων, είναι ευπαθή σε σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις οι οποίες μπορεί να είναι θανατηφόρες σε αυτόν τον πληθυσμό (38).

Στην εικόνα φαίνεται ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της φαγοκυτταρικής δράσης των ουδετεροφίλων. Μετά την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, τα ουδετερόφιλα προσκολλώνται ισχυρά και μεταναστεύουν μέσω του ενδοθηλίου στους ιστούς. Η μετανάστευση των

ουδετερόφιλων στους ιστούς συνεχίζεται μέσω χημειοτακτικών μηχανισμών. Τα ουδετερόφιλα μέσω υποδοχέων του συμπληρώματος (CRs) και υποδοχέων Fcγ αναγνωρίζουν και φαγοκυτταρώνουν τον *S. aureus*. Στη συνέχεια τα βακτήρια που εγκολπώνονται με τη φαγοκυττάρωση και ανευρίσκονται στο κυτταρόπλασμα μέσα σε υπομεμβρανικούς σχηματισμούς, τα φαγοσώματα. Η καταστροφή του φαγοκυτταρωμένου υλικού επιτυγχάνεται με τη σύντηξη του φαγοσώματος με τα αποθηκευτικά κοκκία των ουδετεροφίλων. Ιδιαίτερο ρόλο κατέχουν οι NADPH-εξαρτώμενες οξειδάσες που υπάρχουν στα κοκκία των ουδετερόφιλων, οι οποίες απελευθερώνουν αντιμικροβιακές πρωτεΐνες (AMPs) και δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Πέρα από την ενδοκυττάρια θανάτωση, τα ουδετερόφιλα αποβάλουν το DNA που φέρει ιστόνες και AMPs και με αυτό το μηχανισμό οι *S. aureus* θανατώνονται εξωκυττάρια (1,37).

Εικόνα 1.3. Διαδικασία εξάλειψης *S. aureus* από το ανοσοποιητικό σύστημα.



Πηγή: Spaan AN et al, 2013 (37)

1.4 Φορία και νόσος

Ο *S. aureus* αποτελεί ένα κοινό παθογόνο που αποικίζει τη ρινοφαρυγγική οδό, το δέρμα, το τριχωτό της κεφαλής, το περίνεο και τον γαστρεντερικό σωλήνα (39–42). Η φορία S. *aureus* αναφέρεται στην παρουσία του μικροβίου στο περιβάλλον του ξενιστή

χωρίς να διαταράσσεται η φυσιολογική λειτουργία του ξενιστή. Ασυμπτωματική φορία περιγράφεται σε ποσοστό 20% του γενικού πληθυσμού ενώ παροδική φορία έχει περιγραφεί σε ποσοστά άνω του 50% (42–46). Στους υγιείς ενήλικες η επίπτωση φορίας σε δέρμα και ρινικό βλεννογόνο κυμαίνεται σε ποσοστά από 25 έως 35% (43). Η επίπτωση φορίας στα παιδιά είναι παρόμοια, με αναφερόμενα ποσοστά 20-30% στις ευρωπαϊκές χώρες (44), 20-25% σε χώρες της Β. Αμερικής (42,44) και υψηλότερα σε χώρες της Αφρικής, και στην Ν. Αμερικής (50-60%) (44).

Η ανάπτυξη φορίας και νόσου από *S. aureus* καθορίζεται από παράγοντες που περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά του μικροβίου, του ξενιστή καθώς και από την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών μεταξύ τους (47). Κατά τις πρώτες 8 εβδομάδες ζωής, η φορία του *S. aureus* φτάνει σχεδόν το 50% ενώ ακολούθως παρατηρείται πτώση της συχνότητας της φορίας σε ποσοστό 20% στους 6 μήνες και περαιτέρω πτώση στην ενήλικο ζωή (48). Η ανάπτυξη φορίας είναι πολυπαραγοντικό φαινόμενο που καθορίζεται από τρία στάδια: την έκθεση στο μικρόβιο, την προσκόλληση του μικροβίου και τη διείσδυση στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή (47). Η φορία αποτελεί το πρώτο βήμα για την εκδήλωση νόσου στο ίδιο το άτομο καθώς και σημαντική πηγή μετάδοσης στην κοινότητα (39,42). Αυξημένη μικροβιακή πυκνότητα (microbial density) έχει συσχετισθεί με την εκδήλωση νόσου όπως η οξεία μέση ωτίτιδα και η πνευμονία στους ενήλικες (41). Στα παιδιά ο κίνδυνος εμφάνισης νόσου δεν είναι πάντα ανάλογος του μικροβιακού φορτίου του *S. aureus* στο ρινοφάρυγγα, στα οποία μπορεί να εκδηλωθεί νόσος και σε περιπτώσεις χαμηλής μικροβιακής πυκνότητας (41).

Ο *S. aureus* μπορεί να προκαλεί ήπιες και σοβαρές λοιμώξεις. Αυτές περιλαμβάνουν ήπιες δερματικές εκδηλώσεις όπως πυοδερμία, δοθιήνας, ψευδάνθρακας, ακμή, διαπυήσεις τραυμάτων έως πιο σοβαρές λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων όπως κυτταρίτιδα, ρινοκολπίτιδα και διεισδυτικές λοιμώξεις (οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, πνευμονία, ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία, λοίμωξη ΚΝΣ) (5,6). Ο *S. aureus* προκαλεί νόσους διαμεσολαβούμενες από τοξίνες όπως το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας, η τροφική δηλητηρίαση και το σταφυλοκοκκικό δερματικό αποφολιδωτικό σύνδρομο (SSSS).

1.5 Κλινικές εκδηλώσεις νόσου

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος είναι ένα συχνό παθογόνο που προκαλεί μεγάλο εύρος λοιμώξεων στον άνθρωπο. Είναι το αίτιο πολλών διεισδυτικών και μη διεισδυτικών λοιμώξεων όπως βακτηριαιμία, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα, λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων και λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων καθώς και νόσων διαμεσολαβούμενων από τοξίνη.

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν συμβεί δύο σημαντικές αλλαγές στην επιδημιολογία των λοιμώξεων από *S. aureus*. Η πρώτη αφορούσε την αύξηση του αριθμού των νοσοκομειακών στελεχών και η δεύτερη αφορούσε τη διασπορά στελεχών κοινότητας που προκαλούσαν επιδημίες λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων. Τα τελευταία στελέχη έφεραν συχνά λοιμογόνους παράγοντες και ήταν πολλές φορές ανθεκτικά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

1.5.1 Βακτηριαιμία

Η βακτηριαιμία από *S. aureus* είναι μια από τις σοβαρότερες κλινικές εκδηλώσεις του *S. aureus*. Στις αναπτυγμένες χώρες, η επίπτωση της βακτηριαιμίας από *S. aureus* κυμαίνεται από 10 έως 30 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα-έτη (14,49,50) ενώ η επίπτωση της νόσου στον αναπτυσσόμενο κόσμο είναι 20 έως 35 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα-έτη (14,14,14). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται διεθνώς μια αύξηση των περιπτώσεων λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας από στελέχη MRSA (14,49,51,52). Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, η αύξηση αυτή οφείλεται σε στελέχη κοινότητας ενώ σε χώρες της Ευρώπης περιγράφεται αύξηση των νοσοκομειακών στελεχών MRSA (14,49,53,54).

Η βακτηριαιμία από *S. aureus* ταξινομείται σε επιπλεγμένη και μη επιπλεγμένη. Παράγοντες κινδύνου για επιπλεγμένη ενδοκαρδίτιδα αποτελούν ο εμμένων πυρετός μετά από 72 ώρες, οι θετικές καλλιέργειες αίματος στις 48-96 ώρες και τα κλινικά σημεία συστηματικής λοίμωξης (πετέχειες, αγγειίτιδα κλπ) (69). Πριν από την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών, η θνητότητα της σταφυλοκοκκικής βακτηριαιμίας ήταν 80% (71) ενώ στις μέρες μας κυμαίνεται μεταξύ 15 και 50% (70). Προγνωστικοί δείκτες για δυσμενή έκβαση αποτελούν η μεγάλη ηλικία, οι συ νοσηρότητες και η αυξημένη βαρύτητα της λοίμωξης.

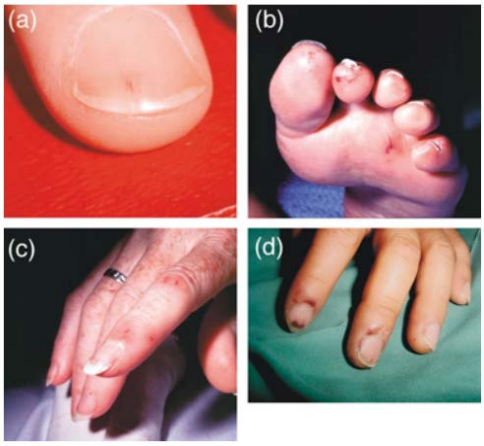
1.5.2 Λοιμώδης ενδοκαρδίτιδα

Ο *S. aureus* αποτελεί την πιο συχνή αιτία λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας στον αναπτυγμένο κόσμο (14,55,56). Η επίπτωσή της υπολογίζεται στις 1.5 με 16 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα-έτη (57,58) ενώ συνολικά ο *S. aureus* ευθύνεται για ποσοστό 16 με 34% όλων των περιπτώσεων ενδοκαρδίτιδας (55,59,60). Μελέτες έχουν δείξει ότι ποσοστό 30-35% των περιπτώσεων λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας οφείλεται σε νοσοκομειακά στελέχη (5,61). Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ενδοκαρδίτιδας από *S. aureus* αποτελούν η ενδοφλέβια χρήση ουσιών, η εμμένουσα βακτηριαιμία, τα προσθετικά υλικά και τα υποκείμενα χρόνια νοσήματα (5,62).

Η διάγνωση βασίζεται στα τροποποιημένα κριτήρια του Duke (63), τα οποία περιλαμβάνουν δεδομένα από το ιστορικό, την κλινική εξέταση, τις καλλιέργειες αίματος και τα υπερηχογραφικά ευρήματα. Σε λίγες περιπτώσεις, ο *S. aureus* δεν ανιχνεύεται στις καλλιέργειες αίματος και απαιτούνται πιο εξειδικευμένες τεχνικές όπως η 16s RNA PCR για την ανίχνευσή του (14,64,65). Η συνολική θνητότητα από *S. aureus* ενδοκαρδίτιδα είναι 22-66% και είναι υψηλότερη σε σχέση με άλλες λοιμώδεις ενδοκαρδίτιδες (5,66). Προγνωστικοί παράγοντες δυσμενούς έκβασης αποτελούν η μεγάλη ηλικία, η καρδιακή ανεπάρκεια και η παρουσία εμφράκτων.

Εικόνα 1.5.2. Περιφερικά στίγματα λοιμώδους ενδοκαρδίτιδας. Α. Αιμορραγίες splinter Β.Βλάβες Janeway C. Οζίδια του Osler. D. Αιμορραγικές βλάβες στην κοίτη των ονύχων.

Πηγή Murrey et al (67)

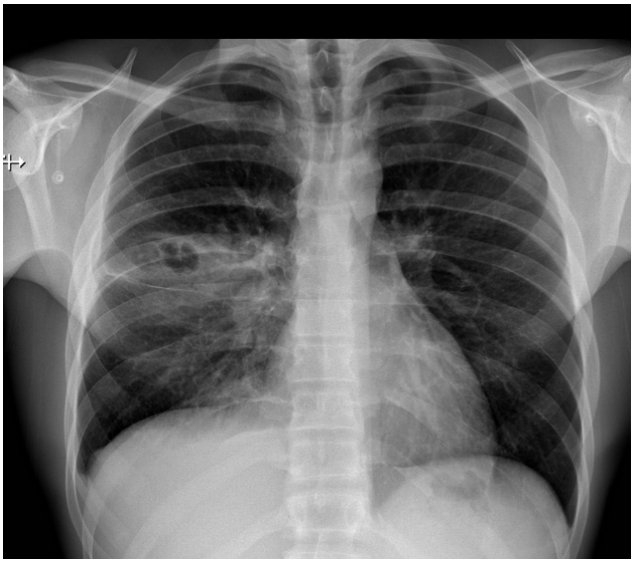


1.5.3 Πνευμονία

Ο *S. aureus* αποτελεί σημαντικό αίτιο πνευμονίας. Ιστορικά, αποτελούσε τη σοβαρότερη επιπλοκή κατά την πανδημία γρίπης το 1918 (68) ενώ αργότερα συνδέθηκε με νοσοκομειακές πνευμονίες που σχετίζονται με μηχανικό αερισμό (ventilator-associated pneumonia, VAP) (69). Ο *S. aureus* είναι επίσης συχνό αίτιο πνευμονίας σε ασθενείς με ινοκυστική νόσο και αποτελεί το συχνότερο αίτιο νοσοκομειακής πνευμονίας (40% των νοσοκομειακών πνευμονιών στις ΗΠΑ) (70). Κατά την τελευταία δεκαετία, περιγράφηκε η ανάδυση στελεχών κοινότητας, συχνά MRSA που είναι PVL θετικά και προκαλούν νεκρωτική πνευμονία (71–75). Στους ενήλικες, οι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση πνευμονίας από *S. aureus* δεν διαφέρουν από άλλες βακτηριακές πνευμονίες και περιλαμβάνουν τον αυξημένο δείκτη μάζας σώματος, το κάπνισμα, τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, τον σακχαρώδη διαβήτη και την ηπατική νόσο. Σε ιστολογικό επίπεδο, η πνευμονία από *S. aureus* χαρακτηρίζεται από αθρόα συρροή πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και από τον σχηματισμό μικροαποστημάτων (76). Λοιμογόνοι παράγοντες όπως η PVL και η α-αιμολυσίνη παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Ευρήματα από πειράματα σε ζώα έχουν υποστηρίξει το σημαντικό ρόλο της PVL (77,78). Ωστόσο, μελέτες σε κλινικά στελέχη έχουν δείξει ότι η παρουσία των γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV* είναι σπάνια σε περιπτώσεις πνευμονίας (14) ενώ άλλες τοξίνες όπως η α-αιμολυσίνη παίζουν πιο καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου (79). Σε κυτταρικό επίπεδο, η α-αιμολυσίνη ενεργοποιεί το φλεγμωνόσωμα NLRP3 και οδηγεί σε νεκρωτική πνευμονική βλάβη (80), ενώ παρεμβαίνει στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και προκαλεί ιστική καταστροφή (81). Να σημειωθεί ότι σε ζωικά μοντέλα, ο εμβολιασμός έναντι της α-αιμολυσίνης παρέχει προστασία από θανατηφόρα πνευμονία (82,83).

Εικόνα 1.5.3. Πνευμονία από *S. aureus* με εικόνα πύκνωσης δεξιού μέσου λοβού με κεντρική νέκρωση και μικρή δεξιά πλευριτική συλλογή.

Πηγή: Smith et al (84)



1.5.4 Λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων

Ο *S. aureus* αποτελεί το πιο κοινό παθογόνο οστεομυελίτιδας και σηπτικής αρθρίτιδας σε ποσοστό 30-60% των περιπτώσεων (85–88). Στην οστεομυελίτιδα παρατηρείται φλεγμονώδης καταστροφή, νέκρωση και οστεονεογένεση. Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης του Waldvogel, η οστεομυελίτιδα μπορεί να προκληθεί με 3 μηχανισμούς: αιματογενώς, κατά συνέχεια ιστού (πχ τραύμα, χειρουργική επέμβαση κλπ) και λόγω αγγειακής ανεπάρκειας (πχ ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη και περιφερική αγγειακή νόσο) (89). Αιματογενώς προσβάλλονται κυρίως οι μεταφύσεις των μακρών οστών στα παιδιά και στους εφήβους και ο αξονικός σκελετός στους ενήλικες με επίπτωση 2 έως 5.8 ανά 100.000 άτομα-έτη με αυξητικές τάσεις (90,91). Το απόστημα Brodie είναι μια εντοπισμένη εστία σταφυλοκοκκικής οστεομυελίτιδας που εμφανίζεται στη μετάφυση των μακρών οστών στους ενήλικες (8). Οι συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις της οστεομυελίτιδας είναι το αιφνίδιας έναρξης, εντοπισμένο οστικό άλγος και ο πυρετός. Από τις απεικονιστικές μεθόδους, η μαγνητική τομογραφία έχει την υψηλότερη ευαισθησία (78-90%) και ειδικότητα (60-90%) και μπορεί να ανιχνεύσει βλάβες εντός 3 με 5 ημερών από την έναρξη της νόσου (92,93).

Πρόσφατες συστηματικές ανασκοπήσεις έχουν δείξει ότι συγκεκριμένοι κλώνοι *S. aureus* συνδέονται με την εμφάνιση οστεομυελίτιδας, η επιδημιολογία των οποίων διαφέρει από περιοχή σε περιοχή (94). Ανάμεσα στα στελέχη που προκαλούν οστεομυελίτιδα στα παιδιά, τα συχνότερα είναι PVL-θετικά στελέχη MRSA που ανήκουν στους κλώνους ST80/CC80 και ST8/CC8/USA300 στην Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής αντίστοιχα (95–97).

Ο *S. aureus* είναι το κυριότερο αίτιο σηπτικής αρθρίτιδας. Η προσβολή της άρθρωσης μπορεί να γίνει είτε με τοπική επέκταση της φλεγμονής είτε αιματογενώς (98). Η νόσος χαρακτηρίζεται από υψηλή νοσηρότητα και η θνητότητα ξεπερνάει το 10% (99). Η επίπτωση σηπτικής αρθρίτιδας από στελέχη MRSA παρουσιάζει αύξηση τα τελευταία χρόνια (14).

Πίνακας 1.5.4. Τοξίνες που συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της οστικής νόσου.

Τοξίνη	Δράση	Αναφορές
Τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας (TSST-1)	Ενεργοποιεί την οστεοκλαστογένεση	(100)
α-αιμολυσίνη	Προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε οστεοβλάστες/ οστεοκλάστες	(101)
PVL	Προκαλεί επιμονή της λοίμωξης	(102)
Πηκτάση	Αναστέλλει τη δράση των οστεοβλαστών	(103)
Διαλυτές στη φαινόλη μοντουλίνες	Έχει κυτταροτοξική δράση για τους οστεοβλάστες	(104–106)

1.5.5 Μηνιγγίτιδα

Ο *S. aureus* είναι σπάνιο αίτιο μηνιγγίτιδας με συχνότητα 4.9 έως 6.4% (107,108). Η διασπορά του *S. aureus* στο ΚΝΣ μπορεί να γίνει είτε αιματογενώς είτε μετά από νευροχειρουργικές παρεμβάσεις (109,110). Η πρωταρχική εστία στην περίπτωση αιματογενούς διασποράς μπορεί να είναι βακτηριαιμία, πνευμονία ή λοίμωξη δέρματος και μαλακών μορίων. Η θνητότητα κυμαίνεται από 14-50% και είναι δυσμενέστερη σε περίπτωση αιματογενούς διασποράς (111,112). Αναφέρεται αύξηση των ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη στελεχών μηνιγγίτιδας τα τελευταία χρόνια (109,111,113,114). Οι κλινικές εκδηλώσεις της *S. aureus* μηνιγγίτιδας δεν διαφέρουν από άλλες βακτηριακές μηνιγγίτιδες. Παράγοντες κινδύνου για δυσμενή έκβαση αποτελούν η αιματογενής διασπορά με θνητότητα πάνω από 50% (115), η συνοσηρότητα, η παρουσία σηπτικού σοκ και η προχωρημένη ηλικία (111,116).

1.5.6 Σηπτική θρομβοφλεβίτιδα

Η σηπτική θρομβοφλεβίτιδα έχει αναφερθεί σε ποσοστό 8% των ασθενών με βακτηριαιμία (14) ενώ τα ποσοστά είναι υψηλότερα σε ασθενείς με μακροχρόνια νοσηλεία και κεντρικούς καθετήρες (117). Στα παιδιά, υπάρχουν πολλές αναφορές εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης από στελέχη CA-MRSA (118,119).

1.5.7 Λοιμώξεις του ουροποιητικού

Ο *S. aureus* είναι μια σπάνια αιτία λοιμώξεων του ουροποιητικού που ανευρίσκεται σε ποσοστό 0.5 έως 1% των θετικών καλλιεργειών ούρων (120,121). Παρατηρείται συχνότερα σε ασθενείς που φέρουν ουροκαθετήρα. Κλινικά πιο συχνά εκδηλώνεται με πυρετό και δυσουρικά ενοχλήματα ενώ μπορεί να σχετίζεται και με βακτηριαιμία από *S. aureus* (122). Παράγοντες κινδύνου για ουρολοίμωξη από MRSA αποτελούν η μακροχρόνια νοσηλεία, η πρόσφατη χρήση αντιβιοτικών και ο καθετηριασμός της ουρήθρας (123,124).

1.5.8 Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (Skin and soft tissue infections, SSTIs)

Ο *S. aureus* προσβάλει το δέρμα και προκαλεί ποικιλία SSTIs που κυμαίνονται από καλοήθεις κλινικές οντότητες όπως το μολυσματικό κηρίο και η μη επιπλεγμένη κυτταρίτιδα έως και σοβαρότερες και σε κάποιες περιπτώσεις απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις. Επίσης, αποτελεί το πιο συχνό παθογόνο που απομονώνεται από χειρουργικές λοιμώξεις, δερματικά αποστήματα και πυώδεις κυτταρίτιδες.

Το μολυσματικό κηρίο είναι η πιο συχνή βακτηριακή δερματική λοίμωξη στα παιδιά (125) η οποία εκδηλώνεται με φυσαλίδες ή βλατίδες οι οποίες προοδευτικά εφελκιδοποιούνται χωρίς συνοδά συστηματικά συμπτώματα. Η πρόγνωσή του μολυσματικού κηρίου είναι γενικά πολύ καλή (14,125–127). Άλλες δερματικές λοιμώξεις που οφείλονται στον *S. aureus* είναι ο δοθιήνας, τα δερματικά αποστήματα, η κυτταρίτιδα, η νεκρωτική φασιίτιδα και η πυομυοσίτιδα (128–130), [Εικόνα 1.5.8].

Εικόνα 1.5.8. Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων από *S. aureus*. Α. Κυτταρίτιδα Β. Δερματικό απόστημα Γ. Μολυσματικό κηρίο Δ. Νεκρωτική λοίμωξη μαλακών μορίων.

Πηγή: Tong et al, 2015 (14), dermnet

Τα τελευταία 15 χρόνια, έχουν αναδυθεί και εξαπλωθεί στελέχη CA-MRSA που προκαλούν επιδημίες SSTIs παγκοσμίως (82,131). Μάλιστα, σε κάποιες περιοχές τα επιδημικά στελέχη CA-MRSA δεν αντικατέστησαν απλώς τα προηγούμενα στελέχη αλλά συσχετίσθηκαν με σημαντική αύξηση της επίπτωσης των SSTIs (132–134). Η αύξηση αυτή ήταν πιο εμφανής σε μικρές ηλικίες και σχετίσθηκε με αύξηση του αριθμού στων εισαγωγών στο νοσοκομείο (134,135). Επιδημιολογικά δεδομένα, έδειξαν κορύφωση της επίπτωσης των SSTIs από MRSA σε πολλές χώρες παγκοσμίως κατά τα έτη 2007-2008 (136–138). Η μοριακή τυποποίηση των στελεχών αυτών έδειξε την επικράτηση συγκεκριμένων κλώνων όπως του κλώνου CA-MRSA USA400 (14,139) που προκαλούσε το 85% των SSTIs στις ΗΠΑ (14,140–143) αν και σπάνια ο κλώνος αυτός ανευρέθηκε στην Ευρώπη και Αυστραλία (14,144).

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται στην κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που προκάλεσαν αύξηση του αριθμού των SSTIs από στελέχη CA-MRSA και φαίνεται ότι συμμετέχουν πολλοί λοιμογόνοι παράγοντες στην παθογένεια της νόσου (145), όπως η Panton-Valentine (PVL), η αιμολυσίνη-α, οι διαλυτές στη φαινόλη μοντουλίνες (PSMs), το καταβολικό κινητό στοιχείο της αργινίνης (ACME).

1.5.9 Νόσοι διαμεσολαβούμενες από τοξίνη

Ο *S. aureus* προκαλεί επίσης νόσο μέσω παραγωγής τοξινών. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται αφορούν κυρίως το δέρμα και τα μαλακά μόρια, την αναπνευστική οδό, τα οστά, τους συνδέσμους και το ενδοθήλιο των αγγείων.

Σταφυλοκοκκικό σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας (staphylococcal toxic shock syndrome, STSS)

Το σύνδρομο της τοξικής καταπληξίας από *S. aureus* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1978 από τους Todd και συνεργάτες σε παιδιά (146). Λίγα χρόνια αργότερα συνδέθηκε με τη χρήση ταμπόν κατά τη διάρκεια της εμμήνου ρύσης (147,148) με επίπτωση 13.7 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες (149). Οι μη εμμηνορυσιακές περιπτώσεις TSS οφείλονται σε λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων και χαρακτηρίζονται από υψηλή θνητότητα (150,151).

Το TSS αφορά μια νόσο μεσολαβούμενη από υπεραντιγόνα. Κάποια στελέχη *S. aureus* εκκρίνουν την εξωτοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας (TSST-1) (152). Η TSST-1 διεγείρει την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων και οδηγεί σε μαζική απελευθέρωση κυτταροκινών (14,14,147). Αυτό οδηγεί σε γενικευμένο φλεγμονώδες σύνδρομο που εκδηλώνεται με σηπτικό σοκ και ανεπάρκεια οργάνων.

Σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια του CDC (153), μια επιβεβαιωμένη περίπτωση πληροί όλα τα κριτήρια: 1. Πυρετός>38.9°C 2. Σημεία καταπληξίας 3. Διάχυτο κηλιδώδες εξάνθημα και συμμετοχή τουλάχιστον 3 συστημάτων: i. Πεπτικού (εμετός ή διάρροια), ii. Μυοσκελετικού (μυαλγία ή αυξημένα επίπεδα κρεατινικής κινάσης), iii. Νεφρών (αύξηση της τιμής της κρεατινίνης), iv. Ήπατος (αύξηση της τιμής των ηπατικών ενζύμων), v. Αιματολογικές διαταραχές vi. Κεντρικού νευρικού συστήματος.

Σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο (Staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS)

Το σταφυλοκοκκικό σύνδρομο αποφολίδωσης του δέρματος αποτελεί μία γενικευμένη, συρρέουσα, επιφανειακά αποφολιδωτική, διαμεσολαβούμενη από τοξίνη νόσο που

εμφανίζεται συχνότερα στα νεογνά και στα παιδιά κάτω των 5 ετών ενώ είναι σπάνια σε ενήλικες με υποκείμενα νοσήματα ή ανοσοκαταστολή (154,155). Στο παρελθόν ήταν γνωστή ως νόσος του Ritter ή αποφολιδωτική δερματίτιδα των νεογνών. Η πρώτη συσχέτιση του SSSS με τον *S. aureus* έγινε το 1891 και το 1967 ο Edmund Lowney περιέγραψε για πρώτη φορά παιδιά με τη χαρακτηριστική αποφολιδωτική εικόνα με θετική καλλιέργεια για *S. aureus* (156). Το 1970 έγινε η απομόνωση των υπεύθυνων τοξινών (157).

Το SSSS προκαλείται από στελέχη που προέρχονται από το δέρμα, τον επιπεφυκότα, τη μύτη, την περιπρωκτική χώρα, τον φάρυγγα ή τον ομφαλό στα νεογνά και παράγουν αποφολιδωτικές τοξίνες (exfoliative toxins, ETs). Η νόσος οφείλεται σε αιματογενή διασπορά της τοξίνης που οδηγεί στην προσβολή μεγάλης επιφάνειας δέρματος.

Κλινικά εκδηλώνεται με πρόδρομα συμπτώματα ανησυχίας και κακουχίας και ακολουθεί η έκθυση περιστοματικού ερυθήματος το οποίο προοδευτικά εξαπλώνεται σε όλο το σώμα. Το δέρμα αποσπάται με την εφαρμογή ελαφράς πίεσης (θετικό σημείο Nikolsky) και ακολουθεί η έκθυση φυσαλίδων και φλυκταινών που ακολουθούνται από απόπτωση του επιθηλίου που τυπικά ξεκινάει από το πρόσωπο, το λαιμό, τις μασχαλιαίες και τις βουβωνικές περιοχές (158). Το απογυμνωμένο δέρμα αποτελεί αιτία απώλειας υγρών, αφυδάτωσης και διαταραχών θερμορύθμισης ενώ μπορεί να αποτελέσει και την πύλη εισόδου άλλων παθογόνων. Οι δερματικές αυτές βλάβες είναι τυπικά στείρες, ωστόσο τα στελέχη *S. aureus* μπορούν να απομονωθούν από τα πιθανά σημεία εισόδου όπως ο ρινιφάρυγγας, οι επιπεφυκότες, η περιπρωκτική χώρα ή η περιοχή του ομφαλού στα νεογνά (14). Το SSSS δεν είναι συχνό, ωστόσο περιγράφονται μικρές επιδημίες τα τελευταία χρόνια (159).

Η θεραπεία περιλαμβάνει υποστηρικτικά μέτρα όπως τη χορήγηση αναλγητικών, ενδοφλέβιων υγρών, την πρόληψη δευτεροπαθών δερματικών λοιμώξεων και τα αντισταφυλοκοκκικά αντιβιοτικά (πχ κλοξακιλλίνη, οξακιλλίνη, κεφαζολίνη, κεφαλεξίνη, δικλοξακιλλίνη) και κλινδαμυκίνη η οποία έχει αντιτοξινική δράση ή βανκομυκίνη σε στελέχη MRSA (154,155). Ο επιπολασμός της παραγωγής τοξινών από στελέχη *S. aureus* ποικίλλει γεωγραφικά αλλά κυμαίνεται μεταξύ του 5% με 10%. Με την κατάλληλη αντιμετώπιση, η θνητότητα είναι χαμηλότερη του 5% (8).

Εικόνα 1.5.9 Σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο από *S. aureus*. Παρατηρείται το ερύθημα και η εκτεταμένη αποκόλληση της επιδερμίδας.

Πηγή: Dermnet (160)

Τροφική δηλητηρίαση από *S. aureus*

Η σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση προκαλείται από τις θερμοανθεκτικές εντεροτοξίνες που βρίσκονται στα τρόφιμα (Staphylococcal enterotoxins, SEs). Μετά την κατανάλωση μολυσμένου φαγητού (όπως κρεατικά και γαλακτοκομικά), η έναρξη της νόσου είναι απότομη. Η νόσος έχει μικρή διάρκεια με τα συμπτώματα να υποχωρούν μετά από 24 ώρες και χαρακτηρίζεται από εμέτους, κοιλιακό άλγος και διαρροϊκές κενώσεις ενώ δεν παρατηρείται πυρετός. Η θεραπεία της νόσου είναι συμπτωματική και δεν ενδείκνυται αντιβιοτική αγωγή (8).

Σε ότι αφορά την παθοφυσιολογία της νόσου, έχουν αναγνωριστεί 23 διαφορετικές εντεροτοξίνες εκ των οποίων η εντεροτοξίνη Α συσχετίζεται συνηθέστερα με τροφική δηλητηρίαση. Με βάση τα εθνικά δεδομένα από την καταγραφή τροφιμογενών νοσημάτων που δημοσιεύθηκαν τον Μάιο του 2022, ποσοστό 25% των νοσοκομείων ανέφεραν την ανίχνευση τοξίνης *S. aureus* (161).

1.6 Μηχανισμοί αντοχής στα αντιμικροβιακά

Ο *S. aureus* αποτελεί παράδειγμα προσαρμοστικής εξέλιξης βακτηρίου σε εποχές ευρείας χρήσης αντιβιοτικών καθώς επιδεικνύει μια εξαιρετική ικανότητα στο να αναπτύσσει

μηχανισμούς αντοχής σε πολλά νέα αντιμικροβιακά, ξεκινώντας από την πενικιλλίνη και τη μεθικιλλίνη έως πιο πρόσφατα τη λινεζολίδη και τη δαπτομυκίνη. Έχουν αναφερθεί πολλοί μηχανισμοί αντοχής και αυτοί περιλαμβάνουν 1. την ενζυμική απενεργοποίηση του αντιβιοτικού (πενικιλλινάση και τροποποιητικά ένζυμα αμινογλυκοσιδών) 2. την τροποποίηση των θέσεων στόχου των αντιβιοτικών με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις πενικιλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες των στελεχών MRSA 3. τη δέσμευση των αντιβιοτικών όπως της βανκομυκίνης και πιθανόν και της δαπτομυκίνης και 4. τις αντλίες εκροής (τετρακυκλινες, φθοροκινολόνες) (162).

1.6.1 Β-λακταμικά αντιβιοτικά

Τα β- λακταμικά αντιβιοτικά χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός β- λακταμικού δακτυλίου στο μόριό τους. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι πενικιλλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι μονοβακτάμες και οι πενέμες καθώς και οι αναστολείς των β-λακταμασών. Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στη σύνδεση του β-λακταμικού δακτυλίου με τις πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (penicillin- binding proteins, PBP) που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα να διακόπτεται η σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης. Ο *S. aureus* παράγει 4 διαφορετικές πενικιλλινοδεσμευτικές πρωτεΐνες (PBP 1,2,3,4), εκ των οποίων οι 3 είναι μεγάλου μοριακού βάρους (PBP1,2,3) και η μια μικρού μοριακού βάρους (PBP4). Η αντοχή των σταφυλοκόκκων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά οφείλεται είτε στην παραγωγή β-λακταμασών, ενζύμων που υδρολύουν τον β-λακταμικό δακτύλιο με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ανενεργού πενικιλλοϊκού οξέος είτε στην τροποποίηση των PBPs. Η παραγωγή των β- λακταμασών ρυθμίζεται από το γονίδιο *blaZ*, που βρίσκεται σε πλασμίδια και μεταφέρεται με φάγο (162,162) και βρίσκεται υπό τον έλεγχο δύο ρυθμιστικών γονιδίων, *blaI* και *blaR1*.

1.6.2 Γλυκοπεπτίδια

Μετά την ανάδυση αντοχής στη μεθικιλλίνη, η βανκομυκίνη αποτέλεσε τον ακρογωνιαίο λίθο της αντιβιοτικής αγωγής των MRSA. Για να δράσει, η βανκομυκίνη πρέπει να ενωθεί με την D- αλανίνη, ώστε να αναστείλει τη βιοσύνθεση του μουκοπεπτιδίου του κυτταρικού

τοιχώματος. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται η ανάδυση στελεχών που δεν είναι ευαίσθητα στην βανκομυκίνη αλλά παρουσιάζουν ενδιάμεση (Vancomycin intermediate *S. aureus*, VISA) ή πλήρη αντοχή (VRSA) ή ετεροαντοχή (h-VISA).

Τα στελέχη VISA παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1996 (163) και σταδιακά περιγράφηκαν και σε άλλες χώρες (164). Οι μηχανισμοί αντοχής διαφέρουν μεταξύ VRSA και VISA. Στα στελέχη VISA, η μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη οφείλεται σε πάχυνση και μείωση του πολυμερισμού της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος, με αποτέλεσμα την αύξηση των διμερών D-ala-D-ala και την κατάληψη της εξωτερικής επιφάνειας από τα συμπλέγματα D-ala-D-ala και γλυκοπεπτιδίων με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση των υπόλοιπων μορίων του αντιβιοτικού να προσεγγίσουν τον στόχο τους (165). Σημαντικό ρόλο για την εκδήλωση λοιμογόνου δράσης έχει το οπερόνιο agr (accessory gene regulator). Ο τύπος ΙΙ έχει περιγραφεί σε στελέχη VISA (166) ενώ απώλεια της λειτουργικότητας του agr συστήματος έχει περιγραφεί σε άλλες μελέτες ότι προσφέρει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης (167).

Αντιθέτως, τα στελέχη VRSA έχουν αποκτήσει τους μηχανισμούς αντοχής στα γλυκοπεπτίδια από τους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη εντερόκοκκους (VRE) (168). Το γονίδιο *vanA* μεταφέρεται οριζόντια με το τρανσποζόνιο Tn1546 από στελέχη *Enterococcus faecalis* μέσω του συζευτικού πλασμιδίου Inc18 και προσδίδει υψηλή αντοχή στη βανκομυκίνη και στην τεϊκοπλανίνη. Τα στελέχη VRSA που έχουν περιγραφεί ως τώρα προέρχονται κυρίως από τις ΗΠΑ και διαθέτουν το οπερόνιο *VanA* που τους προσδίδει υψηλή αντοχή τόσο στη βανκομυκίνη όσο και στην τεϊκοπλανίνη (169,170). Ο μηχανισμός αντοχής ρυθμίζεται από τα γονίδια *vanS* και *vanR* που ενεργοποιούνται παρουσία βανκομυκίνης. Συχνότερα είναι τα στελέχη με ετεροαντοχή. Πρόκειται για στελέχη που ενώ παρουσιάζουν ευαισθησία στη βανκομυκίνη με τις συμβατικές μεθόδους διάχυσης δίσκων, περιέχουν υποπληθυσμούς με ενδιάμεση ή πλήρη αντοχή στη βανκομυκίνη (171). Ο μηχανισμός αυτής της αντοχής σχετίζεται με αλλαγές του μεταβολισμού του κυτταρικού τοιχώματος.

1.6.3 Φθοριοκινολόνες

Οι κινολόνες αναστέλλουν τη δράση της DNA- γυράσης A και της τοποϊσομεράσης IV και αναστέλλουν έτσι τη σύνθεση του βακτηριακού DNA. Η αντοχή στις κινολόνες είναι ενδογενής και χρωμοσωμιακή και οφείλεται είτε σε υπερέκφραση της αντλίας εκροής NorA (172) είτε σε μεταλλάξεις που προκαλούν αλλαγές των αμινοξέων των δύο ένζυμων που είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του DNA.

1.6.4 Λινεζολίδη και Δαπτομυκίνη

Η λινεζολίδη ανήκει στην ομάδα των οξαζολιδινών και αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών μέσω πρόσδεσης στην περιοχή V της υποομάδας 23s του ριβοσώματος. Η πρώτη αναφορά αντοχής στη λινεζολίδη έγινε σε ασθενή με περιτονίτιδα από MRSA (173), που οφειλόταν σε σημειακή μετάλλαξη (αντικατάσταση αδενίνης με γουανίνη στη θέση πρόσδεσης της λινεζολίδης, G2576T), παρόμοιες μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί και σε άλλα στελέχη (174).

Η δαπτομυκίνη έχει ένα μοναδικό μηχανισμό δράσης μέσω πρόσδεσης και διείσδυσης στη βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη παρουσία φυσιολογικών συγκεντρώσεων ιόντων ασβεστίου (175). Η αντοχή στη δαπτομυκίνη έχει σχετισθεί με πολλές μεταλλάξεις σε τουλάχιστον 3 πρωτεϊνικές περιοχές που έχουν ως αποτέλεσμα διαφορές φορτίου κατά μήκος της μεμβράνης και μειωμένη πρόσδεση του αντιβιοτικού στις θέσεις στόχο (176).

Υπάρχουν αναφορές διασταυρούμενης αντοχής σε δαπτομυκίνη και βανκομυκίνη καθώς έχει φανεί ότι στελέχη VISA παρουσιάζουν μικρότερη in vitro ευαισθησία στη δαπτομυκίνη σε σχέση με τα στελέχη που είναι ευαίσθητα στη βανκομυκίνη (177,178).

1.6.5 Αμινογλυκοσίδες

Δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, αφού ενωθούν με μία ή περισσότερες θέσεις των βακτηριακών ριβοσωμάτων. Ο κύριος μηχανισμός αντοχής είναι η παραγωγή αμινογλυκοσιδοτροποποιητικών ενζύμων (ακετυλοτρανσφεράσες, φωσφοτρανσφεράσες και αδενυλοτρανσφεράσες) που τροποποιούν ή αδρανοποιούν τις αμινογλυκοσίδες, καθιστώντας αδύνατη την ένωση τους με το βακτηριακό ριβόσωμα (32). Περισσότερα από 30 ένζυμα έχουν περιγραφεί και τα υπεύθυνα γονίδια φέρονται σε πλασμίδια.

Εκτός από την παραγωγή τροποποιητικών ενζύμων έχουν περιγραφεί χρωμοσωμικές μεταλλάξεις στελεχών *S. aureus* που επηρεάζουν το ηλεκτρικό δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης και προκαλούν αντοχή σε αμινογλυκοσίδες (32).

1.6.6 Φουσιδικό οξύ

Το φουσιδικό οξύ δρα παρεμβαίνοντας στη δράση του παράγοντα επιμήκυνσης G (EF-G) και προκαλεί αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η αντοχή φαίνεται να οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις στο χρωμοσωμιακό γονίδιο *fusA* (179,180).

1.6.7 Μουπιροσίνη

Η μουπιροσίνη προκαλεί αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, μέσω σύνδεσης με τη βακτηριδιακή ισολευκίνο-t-RNA συνθετάση. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως τοπικά για σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις δέρματος καθώς και ως θεραπεία εκρίζωσης στελεχών MRSA. Τα στελέχη των μικροβίων που είναι ανθεκτικά στη μουπιροσίνη φέρουν το *mupA* γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την σύνθεση μιας διαφορετικής ισολευκίνο-t- 54 RNA συνθετάσης, με την οποία δεν μπορεί να συνδεθεί η μουπιροσίνη για να αναστείλει την πρωτεϊνοσύνθεση (181).

1.6.8 Τριμεθοπρίμη και σουλφαμεθοξαζόλη

Ο συνδυασμός τριμεθοπρίμης και σουλφαμεθοξαζόλης, γνωστός και ως κοτριμοξαζόλη χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη. Η δράση της τριμεθοπρίμης έγκειται στην αναστολή του ενζύμου αναγωγάση του διυδροφυλλικού οξέος (DHFR) που καταλύει τη μετατροπή του διυδροφυλλικού σε τετραυδροφυλλικό οξύ. Το τετραυδροφυλλικό οξύ αποτελεί το δότη μεθυλοομάδων, για τη μεθυλίωση της ουρακίλης και τη μετατροπή της σε θυμίνη με αποτέλεσμα την αναστολή της σύνθεσης του DNA. Οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν την ενσωμάτωση της πτεριδίνης στο παρα-αμινο-βενζοϊκό οξύ για το σχηματισμό διυδροπτεοϊκού οξέος μέσω του ενζύμου συνθετάση του διυδροπτεροϊκού οξέος. Η αντοχή στις σουλφοναμίδες οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *dhps* ενώ

σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *dfrB* προσδίδουν μέτρια αντοχή στην τριμεθοπρίμη. Πλήρης αντοχή παρατηρείται με νέο ένζυμο μέσω του πλασμιδιακού γονιδίου *dhfrA* (182).

1.6.9 Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες εισέρχονται στο κύτταρο, προσδένονται στο ριβόσωμα και αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση (162). Η αντοχή του σταφυλοκόκκου στις τετρακυκλίνες, οφείλεται σε ποικίλους μηχανισμούς όπως αντλίες εκροής, τροποποίηση του αντιβιοτικού και τροποποίηση του στόχου δράσης (162). Τα γονίδια *tetM* και *tetO* παρέχουν προστασία του ριβοσώματος καθώς παρεμποδίζουν τη σύνδεση των τετρακυκλινών με τα ριβοσώματα (183). Τα γονίδια *tetK και tetL* αυξάνουν την ενεργό απέκκριση του αντιβιοτικού και βρίσκονται σε μικρά πλασμίδια (184,185). Στελέχη *S. aureus* που διαθέτουν το *tetM* γονίδιο εμφανίζουν αντοχή σε όλα τα αντιμικροβιακά αυτής της κατηγορίας (186).

1.6.10 Μακρολίδες- Λινκοσαμίδες- Στρεπτογραμμίνη Β (MLSB)

Οι μακρολίδες δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Η αντοχή στις μακρολίδες συνδέεται με τρεις μηχανισμούς: τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού, αποβολή του με αντλία εκροής και αδρανοποίηση (187). Η τροποποίηση του στόχου του αντιβιοτικού οφείλεται στην παρουσία των γονιδίων erm (erythromycin ribosome methylase), τα οποία κωδικοποιούν την παραγωγή των πρωτεϊνών Erm, οι οποίες προκαλούν μεθυλίωση στην αδενίνη 2058 του σημείου V του 23SrRNA της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος (MLSB φαινότυπος). Η αντοχή αφορά τις μακρολίδες με 14μελή, 15μελή και 16μελή δακτύλιο, την στρεπτογραμμίνη Β και τις λινκοσαμίδες και είναι συνήθως επαγώγιμη (MLSBi) και σπανιότερα ιδιοσυστασιακή (MLSBc). Για το φαινόμενο της επαγώγιμης αντοχής χρησιμοποιείται η δοκιμασία D test.

Η ικανότητα αποβολής του αντιβιοτικού με αντλία εκροής επάγεται μόνο από τις 14μελείς και 15μελείς μακρολίδες και την στρεπτογραμμίνη Β, ενώ η κλινδαμυκίνη παραμένει σταθερή (MSB φαινότυπος).

Τα γονίδια *ereA ,ereB, mphC και lnuA* προσφέρουν αντοχή μέσω αδρανοποίησης του αντιβιοτικού (187).

Πίνακας 1.6 Αντιπροσωπευτικοί μηχανισμοί αντοχής του *S. aureus* στα αντιμικροβιακά.

Αντιβιοτικά	Γονίδια αντοχής	Μηχανισμός αντοχής
Β-λακτάμες	BlaZ,mecA	Ενζυματική υδρόλυση του β-λακταμικού πυρήνα, μειωμένη συνάφεια για τις PBPs
Γλυκοπεπτίδια	VRSA:vanA	Εγκλωβισμός της βανκομυκίνης στο κυτταρικό τοίχωμα, μειωμένη συνάφεια για τη βανκομυκίνη
Κινολόνες	ParC, Gyr A, B	Μειωμένη συνάφεια για τις κινολόνες
Αμινογλυκοσίδες	Ένζυμα τροποποίησης αμινογλυκοσιδών (πχ aac,aph)	Τροποποίηση αμινογλυκοσίδης μέσω ενζύμων ακετυλίωσης/φωσφορυλίωσης
Τριμεθοπρίμη /Σουλφαμεθοξαζόλη	sulA,dfrB	Υπερπαραγωγή p-αμινοβενζοϊκό οξέος, μειωμένη συνάφεια με τον υποδοχέα DHFR
Τετρακυκλίνες	tetM,tetK,tetL,tetO	Αντλία εκροής
Ερυθρομυκίνη	Erm (A,C)	Αλλαγές στο 23S rRNA
Κλινδαμυκίνη	Erm (A,C)	Αλλαγές στο 23S rRNA
Λινεζολίδη	Cfr	Μεθυλίωση του 23S rRNA που παρεμβαίνει στη σύνδεση στο ριβόσωμα

1.7 Η ανάδυση στελεχών ανθεκτικών στη μεθικιλλίνη (MRSA)

Τα ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη στελέχη περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1960 και προκαλούν σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις και λοιμώξεις κοινότητας όπως λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων, λοιμώξεις οστών και αρθρώσεων, πνευμονία και ενδοκαρδίτιδα (14,188,189). Τα στελέχη MRSA αποτελούν πρόκληση για τους κλινικούς λόγω της υψηλής θνητότητάς, των περιορισμένων θεραπευτικών επιλογών και του υψηλού κόστους (188,190). Στη διεθνή βιβλιογραφία, στελέχη MRSA φαίνεται να σχετίζονται με βαρύτερη κλινική εικόνα και υψηλότερη θνητότητα σε σχέση με τα στελέχη MSSA (191–193). Για παράδειγμα στις ΗΠΑ, ο MRSA συνδέεται με 95.000 διεισδυτικές λοιμώξεις και 19.000 θανάτους ετησίως (14).

Τα στελέχη αυτά είναι ανθεκτικά στα β-λακταμικά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένης της οξακιλλίνης, ναφκιλλίνης, δικλοξακιλλίνης και κεφαζολίνης (194). Στα MSSA στελέχη, οι β-λακτάμες έχουν την ικανότητα να προσδένονται στις πενικιλλινο- δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs) οι οποίες είναι απαραίτητες για τη σύνθεση του μικροβιακού τοιχώματος. Τα στελέχη MRSA φέρουν ένα κινητό γενετικό στοιχείο που λέγεται staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) και το οποίο μεταφέρει το γονίδιο *mecA* το οποίο κωδικοποιεί μια τροποποιημένη PBP (PBP2a) με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά η συγγένεια με τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αποτυγχάνει η αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού τοιχώματος και τα στελέχη MRSA να επιβιώνουν ακόμα και παρουσία β-λακταμικών αντιβιοτικών (195).

1.7.1 HA-MRSA έναντι CA-MRSA

Ιστορικά, τα στελέχη MRSA έχουν σχετισθεί με τις νοσοκομειακές λοιμώξεις (HA-MRSA) (1,196–198). Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, δημοσιεύθηκαν οι πρώτες αναφορές MRSA στελεχών κοινότητας όπου τα ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη στελέχη απομονώνονταν από υγιή άτομα χωρίς παράγοντες κινδύνου για HA-MRSA (199) (200,201). Τα νοσοκομειακά στελέχη MRSA (HA-MRSA) διαφέρουν γενετικά από τα στελέχη MRSA της κοινότητας και μια σημαντική διαφορά τους είναι η SCCmec. Ως τώρα, έντεκα τύποι SCCmec έχουν χαρακτηριστεί (198,202). Τα στελέχη κοινότητας έχουν συσχετισθεί με SCCmec τύπους IV

και V σε αντίθεση με τα νοσοκομειακά στελέχη που χαρακτηρίζονται από SCCmec τύπους I, II και III (14).

Στην αρχή, οι αναφορές στελεχών CA-MRSA ήταν σπάνιες (203). Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, το ενδιαφέρον έχει μετατοπιστεί από τα νοσοκομειακά στελέχη με αντοχή στη μεθικιλλίνη, στα MRSA στελέχη κοινότητας καθώς τα τελευταία προκαλούν όλο και υψηλότερη νοσηρότητα (204–206) παγκοσμίως. Μάλιστα, περιγράφεται μια αλλαγή της επιδημιολογίας των MRSA με αυξητικές τάσεις των CA-MRSA οι οποίοι φαίνεται να αντικαθιστούν τους κλώνους HA-MRSA ακόμα και εντός των νοσοκομείων (207). Σε μια πρόσφατη μελέτη στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ποσοστό 97% ανήκαν στον κλώνο USA300, λοιμώξεις από τον οποίο έχουν πάρει διαστάσεις πανδημίας (14).

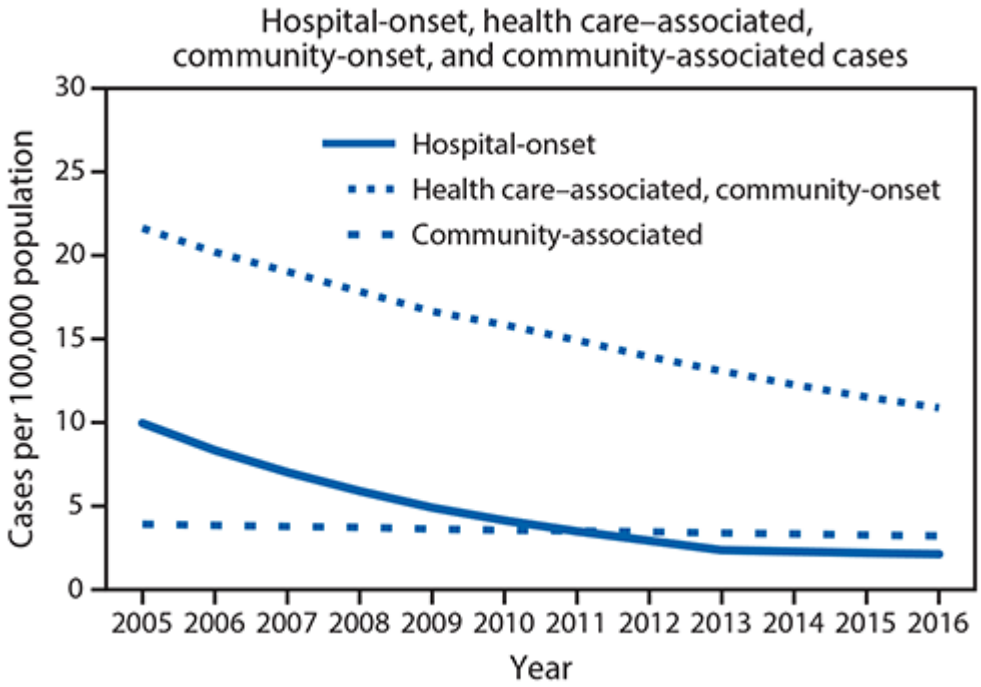
1.7.2 Επιδημιολογία των στελεχών MRSA

Σύμφωνα με στοιχεία του κέντρου ελέγχου και πρόληψης λοιμώξεων (CDC), έχει παρατηρηθεί μείωση των διεισδυτικών λοιμώξεων από MRSA σε νοσοκομεία των Ηνωμένων Πολιτείων Αμερικής από το 2005 έως 2012, με πτωτικές τάσεις για τις σηψαιμίες από MRSA κατά 17.1% κάθε χρόνο. Κατά το χρονικό διάστημα 2013-2016, η επίπτωση παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα (208). Παρά τη μείωση της επίπτωσης των MRSA σηψαιμιών στις ΗΠΑ που έχει καταγραφεί από το 2005, οι λοιμώξεις από *S. aureus* παραμένουν σημαντικό αίτιο νοσηρότητας και θνητότητας (209).

Σύμφωνα με το ευρωπαϊκό κέντρο ελέγχου και πρόληψης λοιμώξεων (ECDC), στην έκθεση της ετήσιας καταγραφής αντιμικροβιακής αντοχής για το έτος 2020, παρουσιάστηκε μείωση του ποσοστού των MRSA στην Ευρώπη για τη χρονική περίοδο 2016-2020. Παρολ’ αυτά ο MRSA παραμένει ένα σημαντικό παθογόνο στην Ευρώπη με υψηλά ποσοστά σε κάποιες χώρες και ετήσια διακύμανση 1.4 έως 49.1% (Εικόνες 1.7.2 A,B) (210).

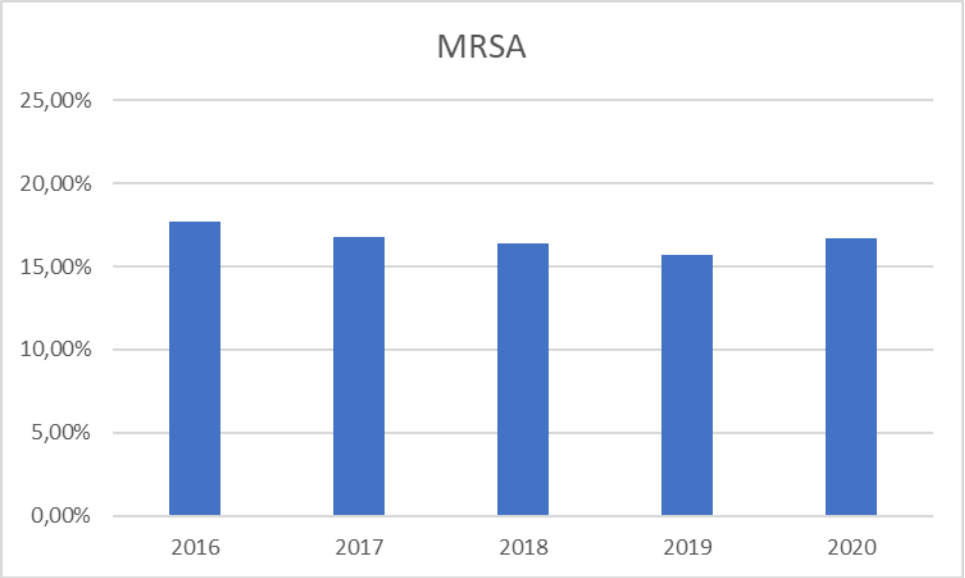
Στη χώρα μας, δεδομένα από τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) δείχνουν υψηλά ποσοστά MRSA ως αίτια νοσοκομειακών βακτηριαιμιών στην πρόσφατη έκθεση του 2019 (Πίνακας 1.7.2) (161).

Εικόνα 1.7.2Α Επιδημιολογία σηψαιμίας από MRSA σε 6 περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής κατά το έτος 2005-2016.



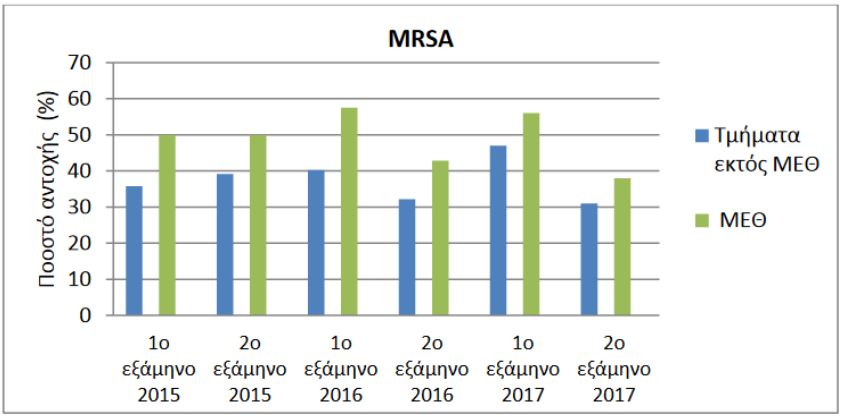
Σημείωση: Τα ποσοστά έχουν προσαρμοστεί με βάση το χρόνο, την ηλικία, το φύλο, την καταγωγή. Πηγή: CDC (209)

Εικόνα 1.7.2Β Ποσοστά διεισδυτικών λοιμώξεων από MRSA στην Ευρωπαϊκή ένωση κατά το χρονικό διάστημα 2016–2020.



Σημείωση: Τα αποτελέσματα βασίζονται στους φαινότυπους αντοχής στην οξακιλλίνη ή κεφοξιτίνη ή σε δεδομένα μοριακού ελέγχου (ανίχνευση του γονιδίου *mecA* με PCR ή θετική δοκιμασία latex συγκόλλησης για ανίχνευση PBP2a). Πηγή: ECDC (210)

Πίνακας 1.7.2 Ποσοστά MRSA ως αίτιο νοσοκομειακής βακτηριαιμίας.



Πηγή: ΕΟΔΥ, Εθνικό σύστημα επιτήρησης για τη μικροβιακή αντοχή, έκθεση δεδομένων δεικτών 2015-2017 (161)

1.8 Μέθοδοι μοριακού χαρακτηρισμού

Ιστορικά, η τυποποίηση του *S. aureus* στηρίχθηκε στη μελέτη των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του μικροβίου. Σημαντική πρόοδο στην κατανόηση της επιδημιολογίας του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου αποτέλεσε η ανάπτυξη της πολυτοπικής ενζυμικής ηλεκτροφόρησης το 1997 από στελέχη που είχαν απομονωθεί μεταξύ 1961 και 1992. Στις μέρες μας, έχουμε στη διάθεσή μας σύγχρονες τεχνικές τυποποίησης που στηρίζονται στη μελέτη γενετικού υλικού των μικροοργανισμών. Μοριακές μέθοδοι εφαρμόζονται ευρέως με σκοπό τόσο τον έλεγχο λοιμώξεων αλλά και τη μελέτη κλώνων σε εθνικό και διεθνές επίπεδο. Παρακάτω θα αναφερθούμε στις κυριότερες μεθόδους μοριακής τυποποίησης του *S. aureus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή και είναι η ηλεκτροφόρηση με παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) και η μέθοδος τυποποίησης πολυτοπικής νουκλεοτιδικής ανάλυσης (Multi Locus Sequence Typing, MLST).

Ηλεκτροφόρηση με παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE)

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε το 1984 και βασίζεται στην πέψη χρωμοσωμάτων των στελεχών με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και την ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης. Χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του χαμηλού κόστους και της υψηλής της

διακριτικής ικανότητας. Η ενδονουκλέαση που χρησιμοποιείται είναι η SmaI, περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει την αλληλουχία CCCGGG και παράγει θραύσματα μεγέθους 10 έως 800Kb στο χρωμόσωμα του *S. aureus* σε αντίθεση με την κλασική ηλεκτροφόρηση που επιτρέπει τον διαχωρισμό θραυσμάτων 500pb έως 20Kb (211). Το 1995, ο Tenover και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα πρωτόκολλο για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της PFGE. Σύμφωνα με αυτούς, στελέχη με ίδιο αποτύπωμα στην ηλεκτροφόρηση πηκτώματος σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο ανήκουν στον ίδιο κλώνο ενώ διαφορές άνω των έξι ζωνών σημαίνει ότι τα στελέχη δεν είναι γενετικά συγγενή (212). Ομοίως, σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα κριτήρια του Miragaia και συνεργατών, διαφορές στις ζώνες λιγότερο από 79% θεωρούνται ότι ανήκουν στον ίδιο PFGE τύπο (213). Η ηλεκτροφόρηση πηκτώματος σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο κατέστη η κύρια μέθοδος επιδημιολογικής μελέτης του *S. aureus*. Παρά τα πλεονεκτήματά της, η PFGE δεν επαρκεί για τη μελέτη της παγκόσμιας επιδημιολογίας. Έχοντας ως κύριο μειονέκτημα αυτό της επαναληψιμότητας (214,215).

Πολυτοπική νουκλεοτιδική ανάλυση (Multi Locus Sequence Typing, MLST)

Το 2000, ο Enright και οι συνεργάτες του περιέγραψαν για πρώτη φορά τη χρήση της μεθόδου για τον χαρακτηριστικό στελεχών MSSA και MRSA (216). Πρόκειται για την βασικότερη τεχνική μοριακής τυποποίησης του *S. aureus*, η οποία βασίζεται στη σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων 450-500bp επτά διατηρημένων, housekeeping γονιδίων του *S. aureus* (*arcC,aroE,gmk,glpF,pta,tpi,yqiL*) που είναι παρόντα σε όλα τα στελέχη του είδους. Τα στελέχη θεωρούνται ότι ανήκουν στην ίδια ομάδα αν 5 από 7 διατηρημένα γονίδια ανήκουν στην ίδια αλληλουχία. Τα αποτελέσματα της MLST καταχωρούνται σε διεθνείς βιβλιοθήκες, επιτρέποντας συγκρίσεις των στελεχών. Η βάση πρόσβασης είναι η http://www.mlst.net.

Πίνακας 1.8 Λίστα διατηρημένων γονιδίων που χρησιμοποιούνται στην τεχνική MLST (216)

Ένζυμο	Γονίδιο
Carbamate kinase	*arc*
Shikimate dehydrogenase	*aroE*
Glycerol kinase	*glpF*
Guanylate kinase	*Gmk*
Phosphate acetyltransferase	*Pta*
Triosephosphato isomerase	*Tpi*
Acetyl coenzyme A acetyltransferase	*Yqi*

2.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή κλινικών στελεχών και ταξινόμηση

Μελετήθηκαν παιδιά και έφηβοι κάτω των 18 ετών που νοσηλεύτηκαν λόγω λοίμωξης από *S. aureus* επιβεβαιωμένης με καλλιέργεια κατάλληλου κλινικού δείγματος στα παιδιατρικά τμήματα και στις ειδικές μονάδες του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου από 1η Ιανουαρίου 2015 έως και 31 Δεκεμβρίου 2018. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν καλλιέργειες δερματικών βλαβών, πύου, υλικού παρακεντήσεων, αίματος, πτυέλων, βρογχικού εκπλύματος, εγκεφαλονωτιαίου υγρού καθώς και καλλιέργειες ρινικού επιχρίσματος σε περιπτώσεις νόσου διαμεσολαβούμενης από τοξίνη. Στη μελέτη μας δεν συμπεριλήφθηκαν στελέχη ρινικών επιχρισμάτων που εξέφραζαν φορία από *S. aureus.* Σε περίπτωση πολλαπλών δειγμάτων από τον ίδιο ασθενή, το δείγμα συμπεριλήφθηκε στη μελέτη μια φορά. Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν εκείνα που λαμβάνονταν κατά τη διάγνωση και δεν επιβαρύνθηκαν οι ασθενείς με επιπρόσθετες δειγματοληψίες για τους σκοπούς της μελέτης μας.

2.2 Ορισμοί

Τα στελέχη ταξινομήθηκαν με βάση το ιατρικό ιστορικό σε λοιμώξεις κοινότητας (Community-associated, CA), νοσοκομειακές λοιμώξεις (Hospital-associated, HA) και νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα (community onset, Healthcare-Associated, COHA). Με βάση την κλινική εικόνα, οι λοιμώξεις ταξινομήθηκαν σε διεισδυτικές, μη διεισδυτικές και σε διαμεσολαβούμενες από τοξίνη. Διεισδυτικές θεωρήθηκαν οι λοιμώξεις στις οποίες η απομόνωση του παθογόνου έγινε από φυσιολογικά στείρα περιοχή όπως αίμα, αρθρικό υγρό, περιτόναιο.

2.3 Συλλογή δεδομένων

Για τα παιδιά και εφήβους που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη, καταγράφηκαν τα δημογραφικά στοιχεία, οι κλινικές εκδηλώσεις, η διάρκεια νοσηλείας και η έκβασή τους. Τα στοιχεία συγκεντρώθηκαν σε πίνακες και ακολούθησε σύγκριση και στατιστική ανάλυση των επιμέρους ομάδων.

2.4 Καλλιέργεια και ταυτοποίηση στελεχών *S. aureus*

Για τις καλλιέργειες των κλινικών δειγμάτων ακολουθήθηκαν οι συμβατικές μέθοδοι. Η ταυτοποίηση των στελεχών *S. aureus* έγινε με βάση τη μορφολογία των αποικιών, τη χρώση Gram, τη δοκιμασία καταλάσης και πηκτάσης και με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek2 (bioMérieux, Marcy l' Etoile, France).

2.5 Έλεγχος ευαισθησίας σε αντιβιοτικά

Έγινε έλεγχος ευαισθησίας στα παρακάτω αντιμικροβιακά με τη χρήση του συστήματος Vitek 2 : Πενικιλλίνη, οξακιλλίνη, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, γενταμυκίνη, τομπραμυκίνη, σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη, λινεζολίδη, τεϊκοπλανίνη, βανκομυκίνη, τετρακυκλίνη, τιγκεκυκλίνη, φουσιδικό οξύ, μουπιροσίνη, ριφαμπικίνη, φωσφομυκίνη, νιτροφουραντοϊνη και τριμεθοπρίμη/σουλφομεθοξαζόλη (TMP-SMX). Για τη ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) του 2018 (217). Για τον ποιοτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη *S. aureus* ATCC 25923 και *S. aureus* ATCC 43300. Τα στελέχη ταξινομηθήκαν φαινοτυπικά σε ευαίσθητα στη μεθικιλλίνη (MSSA) ή ανθεκτικά στη μεθικιλλίνη (MRSA) με βάση τη δοκιμασία διάχυσης δίσκων κεφοξιτίνης και τη δοκιμασία latex συγκόλλησης για την ανίχνευση της PBP2a (bioMerieux). Για την ανίχνευση της επαγώγιμης αντοχής στην κλινδαμυκίνη χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία D-test σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI (217). Η παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν τη λευκοκτονίνη Panton–Valentine, την τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας 1, αποφολιδωτικές τοξίνες, πρωτεϊνών προσκόλλησης στη φιμπρονεκτίνη A και B ελέγχθηκε με PCR. Όλα τα στελέχη αποθηκεύτηκαν σε brain heart infusion broth (BHI) με 20% γλυκερόλη στους -80°C για περαιτέρω έλεγχο.

2.6 Μοριακή διερεύνηση κλινικών στελεχών

Σε συνεργασία με το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Σταφυλοκόκκκων πραγματοποιήθηκε μοριακή μελέτη των κλινικών στελεχών *S. aureus* η οποία περιελάβανε έλεγχο για την παρουσία γονιδίων αντοχής στη μεθικιλλίνη (*mecA*,*mecC*), γονιδίων τοξινών όπως η Panton-

Valentine λευκοκτονίνη (*lukS/lukF-PV*), η τοξίνη του συνδρόμου της τοξικής καταπληξίας (*tst*), γονιδίων των επιδερμολυσινών ETA και ETB (*eta,etb*) και γονιδίων της προσκόλλησης στη φιμπρονεκτίνη *(fnbA,fnbB*). Έγινε τυποποίηση με τη χρήση ηλεκτροφόρησης σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (PFGE) και αντιπροσωπευτικά στελέχη τυποποιήθηκαν κατά MLST.

2.6.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA

Μετά την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών σε αιματούχο άγαρ, τα τρυβλία επωάστηκαν για 18-24 ώρες στους 37°C. Σε 1 ml αποσταγμένου H_20 προστέθηκαν αποικίες του βακτηρίου ώστε να δημιουργηθεί εναιώρημα θολερότητας 2 της κλίμακας McFarland και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 10 λεπτά. Μετά από απόρριψη του υπερκειμένου, έγινε επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl λυτικού ρυθμιστικού διαλύματος (το οποίο περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100 και 1 mM EDTA pH 8.0) και 1 μl πρωτεϊνάση K και επώαση στους 56°C για 1 ώρα. Ακολούθησε επώαση στους 95°C για 10 λεπτά, ώστε να αδρανοποιηθεί η πρωτεϊνάση K και ακολούθησε PCR ή φύλαξη των δειγμάτων σε θερμοκρασία -20°C.

2.6.2 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1983 από τον Dr Mullis (218) και επιτρέπει την παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας αλληλουχίας DNA. Με τη χρήση της DNA πολυμεράσης, από ένα μονόκλωνο μόριο DNA συντίθεται το συμπληρωματικό του. Τα μονόκλωνα μόρια παράγονται όταν τα δίκλωνα μόρια θερμανθούν σε υψηλές θερμοκρασίες και το σημείο εκκίνησης της σύνθεσης του DNA καθορίζεται με τη χρήση κατάλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εναρκτήριων μορίων (εκκινητές, primers). Το πρωτόκολλο της PCR περιλαμβάνει 25-35 επαναλαμβανόμενους κύκλους, εκ των οποίων κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη (denaturation). Αρχικά το δίκλωνο DNA θερμαίνεται στους 94-96°C για περίπου 5 min υπό την παρουσία των δύο εκκινητών και τεσσάρων τριφωσφονουκλεοτιδίων. (Deoxyribonucleoside triphosphates, dNTPs, 2’-

deoxynucleoside 5’- Triphosphate, dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Σε αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλωνα μόρια DNA αποχωρίζονται και παράγονται οι μονόκλωνες αλυσίδες που θα χρησιμεύσουν ως εκμαγεία για τους εκκινητές και την DNA πολυμεράση.

2. Υβριδισμό (annealing). Στη συνέχεια, το μίγμα ψύχεται ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μόρια του μονόκλωνου DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την εξειδίκευση της αντίδρασης PCR.
3. Επέκταση (extension). Στο επόμενο βήμα, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, περιοχή βέλτιστης θερμοκρασίας για την θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση, ώστε να εκτελέσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Η προέκταση γίνεται με κατεύθυνση 5'→3' (elongation).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 10x: 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl

Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος επιτρέπει στο pH να διατηρείται μεταξύ 8,3 και 8,5 σε θερμοκρασία δωματίου. Στη θερμοκρασία των 72 ^{o}C, το ph μειώνεται σε τιμές ~7,2 που είναι κατάλληλες για τη δράση των περισσότερων θερμοσταθερών DNA πολυμερασών.

2. 50 mM $MgCl_2$

   Η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} έχει μεγάλη επίδραση στην ειδικότητα και στην ποσότητα του προϊόντος της PCR. Περίσσεια Mg^{2+} έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση μη ειδικού προϊόντος, ενώ το έλλειμά τους θα μειώσει την ποσότητα του προϊόντος (219,220).

3. Taq DNA polymerase (KAPA BIOSYSTEMS).

   Η Taq DNA πολυμεράση απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο Thermus aquaticus (Taq DNA polymerase) (221) και διαθέτει 5’→3’ εξωνουκλεοτιδική δράση. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ενζυμική δράση της Taq πολυμεράσης είναι οι 72°C, αλλά είναι αρκετά σταθερή ακόμα και

στους 94ºC. Προστίθεται μόνο μία φορά στην αρχή της αντίδρασης και παραμένει ενεργός σε όλη την διάρκεια των κύκλων, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της PCR με την χρήση ειδικών οργάνων, των θερμικών κυκλοποιητών (thermal cyclers). Κάτω από τις συνηθισμένες συνθήκες το ποσό της Taq πολυμεράσης περιορίζεται μετά από τους 25- 30 κύκλους (222).

4. Ζεύγος συνθετικών εκκινητών (primers), ειδικών για κάθε γονίδιο, συγκέντρωσης 100 pmol/μl.

   Τα ολιγονουκλεοτίδια (primers) που χρησιμοποιούνται στην PCR συνήθως έχουν μήκος 16-24 βάσεις. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ολιγονουκλεοτιδίων μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση έκτοπων θέσεων, με αποτέλεσμα την ενίσχυση μη-θεμιτών αλληλουχιών. Επίσης, τα προϊόντα της αντίδρασης επηρεάζονται από την καθαρότητα αλλά και την ποιότητα των εκκινητών.

5. Μίγμα 25 mM των τεσσάρων τριφωσφονουκλεοτιδίων (Deoxyribonucleoside triphosphates, dNTPs, 2’-deoxynucleoside 5’-Triphosphate, dATP, dTTP, dCTP, dGTP,ThermoScientific LSG).

   Τα dNTPs αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση της νέα αλυσίδας DNA.

6. Βακτηριακό DNA

Μετά το τέλος των κύκλων της αντίδρασης, λήφθηκε δείγμα 15 μl από το DNA προϊόν της PCR το οποίο αναμίχθηκε με 4 μl loading buffer (50% Glucerol, Life Technologies, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.25% bromophenol blue, Merck) και αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 x TBE στα 60 Volts για 1 ώρα. Τα αποτελέσματα φωτογραφήθηκαν σε υπεριώδες φως (UV).

2.6.3 Έλεγχος ποιότητας παραγόμενου DNA με PCR

Η ποιότητα του παραγόμενου DNA ελέγχθηκε με ενίσχυση της περιοχής V του γονιδίου 23S rRNA, μεγέθους 420 bp (223) με PCR. Τόσο το 16S όσο και το 23S rRNA χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό έκφρασης και σταθερότητα (224). Το γονίδιο του 23S rRNA είναι σταθερός δείκτης και έχει χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση του *S. aureus* (225). Οι

αλληλουχίες των εκκινητών, οι συνθήκες της αντίδρασης, καθώς και η σύνθεση του μίγματος παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 2.6.3α: Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA.

Εκκινητές	**Αλληλουχία νουκλεοτιδίων**	**Βιβλιογραφική αναφορά**
23S rRNA-F	5'-GCGGTCGCCTCCTAAAAG-3'	(223)
23S rRNA -R	5'-ATCCCGGTCCTCTCGTACTA-3'	(223)

Πίνακας 2.6.3β: Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για τον έλεγχο της ποιότητας του DNA.

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μL)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης χωρίς $MgCl_2$	5
$MgCl_2$(50Mm)	1.5
Εκκινητής 1 (10pmol/μl)	0.5
Εκκινητής 2 (10pmol/μl)	0.5
Μίγμα dNTPs(25Mm)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.4
Αποστειρωμένο νερό	38.7
DNA (100ng/μl)	3
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 2.6.3.γ: Συνθήκες αντίδρασης της PCR για τον έλεγχο ποιότητας του DNA

Στάδιο αντίδρασης	**Αρχική αποδιάταξη**	**Αποδιάταξη**	**Αναδιάταξη**	**Επιμήκυνση**	**Τελική επιμήκυνση**
Θερμοκρασία (°C)	95	94	55	72	72
Χρόνος	5min	30sec	30sec	30sec	10min
		35 κύκλοι			

2.6.4 Έλεγχος ύπαρξης γονιδίου αντοχής στη μεθικιλλίνη

Ο έλεγχος αντοχής στη μεθικιλλίνη μελετήθηκε με ειδικούς εκκινητές και την εφαρμογή της PCR για τον έλεγχο της παρουσίας του γονιδίου *mecA* και *mecC*. Το γονίδιο *mecA* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PBPα, ενώ το γονίδιο *mecC* κωδικοποιεί το ομόλογό της, PBP2α/2′. Και τα δύο γονίδια προσφέρουν με τα προϊόντα τους ανθεκτικότητα στα β-λακταμικά αντιβιοτικά στα στελέχη *S. aureus* και τα καθιστούν MRSA. Η ανίχνευση των γονιδίων *mecA* και *mecC* πραγματοποιήθηκε με PCR και χρησιμοποιήθηκε το DNA σε διάλυμα (226,227). Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων των εκκινητών και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στους παρακάτω πίνακες. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα στελέχη ATCC49775 και LGA251, αντίστοιχα (NCTC 13552) (14,227).

Πίνακας 2.6.4.α: Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων *mecA* και *mecC*.

Εκκινητές	**Αλληλουχία νουκλεοτιδίων**	**Βιβλιογραφική αναφορά**
mecA1	5'-ACTGATTAACCCAGTACAGATCCTTTC-3'	(226)
mecA2	5'- TCCAAACTTTGTTTTTCGTGTCTTT-3'	(226)
mecC1	5'- TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA -3'	(227)
mecC2	5'- CCTGAATC[W]GCTAATAATATTTC -3'	(227)

Πίνακας 2.4.6β: Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *mecA*.

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μL)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης χωρίς $MgCl_2$	5
$MgCl_2$(50Mm)	1.5
Εκκινητής 1 (10pmol/μl)	4
Εκκινητής 2 (10pmol/μl)	4.5
Μίγμα dNTPs (25mM)	0.5
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.2
Αποστειρωμένο νερό	28.3
DNA (100ng/μl)	6
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 2.4.6.γ: Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *mecC*.

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μL)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης χωρίς $MgCl_2$	5
$MgCl_2$(50Mm)	2.5
Εκκινητής 1 (100pmol/μl)	0.5
Εκκινητής 2 (100pmol/μl)	0.5
Μίγμα dNTPs (25mM)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.4
Αποστειρωμένο νερό	38.2
DNA (100ng/μl)	2.5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 2.4.6.δ: Συνθήκες αντίδρασης της PCR για ανίχνευση του γονιδίου *mecA* και *mecC*.

Στάδιο αντίδρασης	**Αρχική αποδιάταξη**	**Αποδιάταξη**	**Αναδιάταξη**	**Επιμήκυνση**	**Τελική επιμήκυνση**
Θερμοκρασία (°C)	95	95	58	72	72
Χρόνος	10min	2min	1min	2min	4min
		30 κύκλοι			

2.6.5 Ανίχνευση των γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV* και *tst*

Η λευκοκτονίνη Panton-Valentine κωδικοποιείται από τα γονίδια *lukS-PV/lukF-PV* και η τοξίνη TSST-1, υπεύθυνη για το σύνδρομο τοξικής καταπληξίας κωδικοποιείται από το γονίδιο *tst*. Για την ανίχνευση με PCR των γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV* και *tst*, χρησιμοποιήθηκε το DNA σε διάλυμα (228). Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών των γονιδίων, η σύνθεση των μιγμάτων και οι συνθήκες της PCR που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 2.6.5α: Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV* και *tst*.

Εκκινητές	**Αλληλουχία νουκλεοτιδίων**	**Στέλεχος αναφοράς**	**Μέγεθος προϊόντος (bp)**	**Βιβλιογραφική αναφορά**
PVL1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	ATCC49775	433	(14)
PVL2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC			(14)
TST1	TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT	Fri 913	180	(228)
TST2	TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT			(228)

Πίνακας 2.6.5.β: Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV* και *tst*.

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μL)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης χωρίς $MgCl_2$	5
$MgCl_2$(50Mm)	1.5
Εκκινητής 1 (10pmol/μl)	0.5
Εκκινητής 2 (10pmol/μl)	0.5
Μίγμα dNTPs(25Mm)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.4
Αποστειρωμένο νερό	38.7
DNA (100ng/μl)	3
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 2.6.5γ: Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση γονιδίων *lukS-PV/lukF-PV*.

Στάδιο αντίδρασης	**Αρχική αποδιάταξη**	**Αποδιάταξη**	**Αναδιάταξη**	**Επιμήκυνση**	**Τελική επιμήκυνση**
Θερμοκρασία (°C)	94	94	55	72	72
Χρόνος	5min	30sec	30sec	1min	10min
		30 κύκλοι			

Πίνακας 2.6.5.δ: Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *tst*.

Στάδιο αντίδρασης	**Αρχική αποδιάταξη**	**Αποδιάταξη**	**Αναδιάταξη**	**Επιμήκυνση**	**Τελική επιμήκυνση**
Θερμοκρασία (°C)	96	95	55	72	72
Χρόνος	3min	1min	30sec	30sec	5min
		40 κύκλοι			

2.6.6 Ανίχνευση γονιδίων επιδερμολυτικών τοξινών (*eta,etb)*

Ο έλεγχος για την παρουσία γονιδίων επιδερμολυτικών τοξινών ETA και ETB έγινε με PCR με κατάλληλους εκκινητές. Στους πίνακες παρατίθενται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών, η σύνθεση του μίγματος αντίδρασης για κάθε γονίδιο και οι θερμικές συνθήκες των αντιδράσεων PCR.

Πίνακας 2.6.6α: Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση γονιδίων επιδερμολυτικών τοξινών (*eta,etb*).

Εκκινητές	**Αλληλουχία νουκλεοτιδίων**	**Στέλεχος αναφοράς**	**Μέγεθος προϊόντος (bp)**
ETA1	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	A920211	188
ETA3	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC		
ETB1	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC		612
ETB2	AGTGAACTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC		

Πίνακας 2.6.6.β: Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση γονιδίων *eta/etb*.

Μίγμα αντίδρασης	**Ποσότητα (μL)**
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης χωρίς $MgCl_2$	5
$MgCl_2$ (50Mm)	1.5
Εκκινητής 1	0.5
Εκκινητής 2	0.5
Μίγμα dNTPs (25Mm)	0.4
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.4
Αποστειρωμένο νερό	39.2
DNA (100ng/μl)	2.5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 2.6.6.γ: Συνθήκες αντίδρασης της PCR για των *eta/etb* γονιδιων.

Στάδιο αντίδρασης	**Αρχική αποδιάταξη**	**Αποδιάταξη**	**Αναδιάταξη**	**Επιμήκυνση**	**Τελική επιμήκυνση**
Θερμοκρασία (°C)	95	94	55	72	72
Χρόνος	5min	30sec	30sec	1min	10min
		30 κύκλοι			

2.6.7 Ανίχνευση των γονιδίων προσκολλητινών *(fnba, fnbB)*

Ο έλεγχος για την παρουσία προσκολλητινών έγινε με PCR με κατάλληλους εκκινητές για την ανίχνευση των γονιδίων *fnbA* (fibronectin binding protein A) και *fnbB* (fibronectin binding protein B). Στους πίνακες παρατίθενται οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών, η σύνθεση του μίγματος αντίδρασης για κάθε γονίδιο και οι θερμικές συνθήκες των αντιδράσεων PCR.

Πίνακας 2.6.7α: Νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο γονιδίων παραγωγής προσκολλητινών.

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μέγεθος προϊόντος	Στελέχη αναφοράς
FnbA	fnbAf1	TAGGAACTGAAAATGGTCAC	1026	A21913
	fnbAR	GAAGCAATCAGAAAACACTC		
FnbB	fnbB1	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT	524	FRI1151
	fnbB2	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC		

Πίνακας 2.6.7β: Σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR για τον έλεγχο της παρουσίας των γονιδίων *fnbA, fnbB*.

Μίγμα αντίδρασης	Ποσότητα (μL)
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενίσχυσης χωρίς $MgCl_2$	5
$MgCl_2$(50Mm)	1.5
Εκκινητής 1 (10pmol/μl)	1
Εκκινητής 2 (10pmol/μl)	1
Μίγμα dNTPs (25Mm)	0.5
Taq DNA polymerase (5IU/μl)	0.5
Αποστειρωμένο νερό	38
DNA (100ng/μl)	2.5
Τελικός όγκος	50

Πίνακας 2.6.7γ: Συνθήκες αντίδρασης της PCR για την ανίχνευση των γονιδίων *fnbA,fnbB.*

Στάδιο αντίδρασης	**Αρχική αποδιάταξη**	**Αποδιάταξη**	**Αναδιάταξη**	**Επιμήκυνση**	**Τελική επιμήκυνση**
Θερμοκρασία (°C)	95	94	55	72	72
Χρόνος	5min	30sec	30sec	1min	10min
		30 κύκλοι			

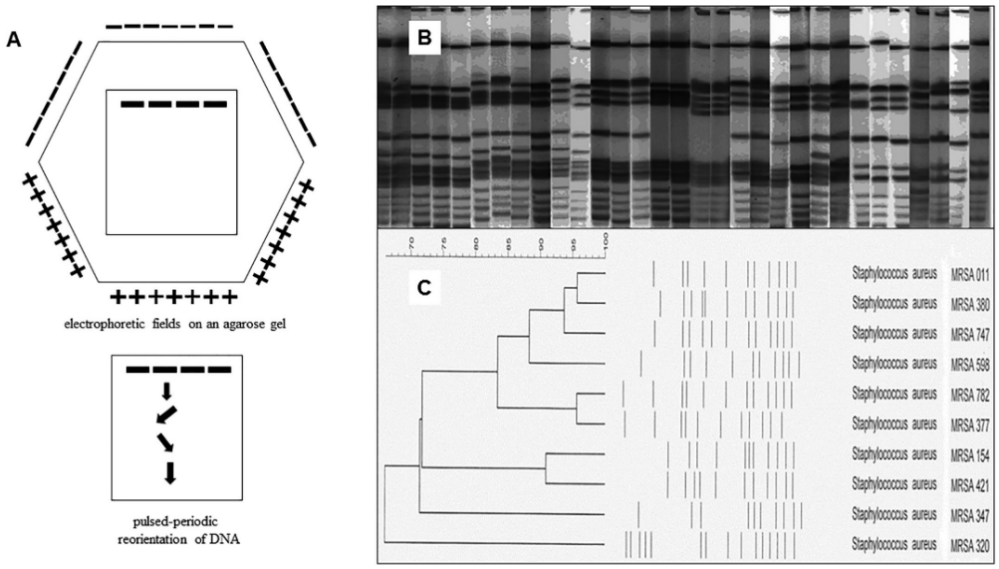
2.7 Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μοριακή τεχνική για την αποτύπωση (fingerprinting) βακτηριακών στελεχών και την επιδημιολογική επιτήρηση στελεχών *S. aureus* (14). Η τεχνική στηρίζεται στη χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων αγαρόζης με μεταβαλλόμενο προσανατολισμό ηλεκτρικού πεδίου προκείμενου να διαχωριστούν θραύσματα DNA που έχουν προκύψει από την πέψη του χρωμοσώματος των μικροοργανισμών με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιούνται στην PFGE αναγνωρίζουν σπάνια εμφανιζόμενες αλληλουχίες στο γονιδίωμα του βακτηρίου με αποτέλεσμα να προκύπτουν μεγάλα θραύσματα. Η PFGE μπορεί να αναλύσει θραύσματα DNA με μεγέθη που κυμαίνονται από περίπου 30 kb μέχρι πάνω από 1 Mb (14). Μεγάλα τμήματα DNA, διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους και σχηματίζουν ένα ξεχωριστό πρότυπο επί της γέλης.

Η PFGE είναι μια τεχνική με υψηλή ευαισθησία, χαμηλό κόστος και υψηλή διακριτική ικανότητα που χρησιμοποιείται ευρέως σε επιδημιολογικές μελέτες (229–232). Παρά τα πλεονεκτήματά της, παραμένει μια τεχνικά απαιτητική, χρονοβόρα μέθοδος, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της οποίας μπορεί να επηρεαστεί από υποκειμενικότητα (233–235). Στους περιορισμούς της μεθόδου περιλαμβάνονται και η δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων καθώς και η αδυναμία διάκρισης μεταξύ ζωνών με παρόμοιο μέγεθος που διαφέρουν σε ποσοστό κάτω του 5% (236). Τα αποτελέσματα της

PFGE μπορούν να συσχετισθούν και να σχεδιαστεί ένα δενδρόγραμμα συγκρίνοντας τα μοριακά βάρη των θραυσμάτων DNA μέσω του προγράμματος FPQuest (Bio-Rad). Το 1995, ο Tenover και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα πρωτόκολλο για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της PFGE. Σύμφωνα με αυτό, στελέχη με ίδιο αποτύπωμα στην ηλεκτροφόρηση πηκτώματος σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο ανήκουν στον ίδιο κλώνο ενώ διαφορές άνω των έξι ζωνών σημαίνει ότι τα στελέχη δεν είναι γενετικά συγγενή (212). Ομοίως, σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα κριτήρια του Miragaia και συνεργατών, διαφορές στις ζώνες λιγότερο από 79% θεωρούνται ότι ανήκουν στον ίδιο PFGE τύπο (213).

Εικόνα 2.7. Σχηματικό διάγραμμα των θραυσμάτων DNA σε ηλεκτροφόρηση παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου και δενδρόγραμμα (237).



2.7.1 Απομόνωση DNA και εγκλεισμός σε δίσκους αγαρόζης

Με την μέθοδο αυτή απομονώθηκε το χρωμοσωμικό DNA από τα βακτήρια μέσα σε δίσκους αγαρόζης ώστε να χρησιμοποιηθεί στην PFGE για την κατάταξη των βακτηριακών στελεχών σε κλώνους.

Υλικά

1. Tryptic Soy Broth (TSB) (BBL)

2. Low Melting Temperature Agarose (Sea Plaque, FMC Bioproducts)

3. Διάλυμα PIV (10 mM Tris, 1 M NaCl)

4. Λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα EC (6 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.2% Na-deoxycolate, 0.5% Na-laurysarcosine, Sigma, 50 μg/ml RNAase A, 100 μg/ml Lysozyme, 50 μg/ml Lysostaphin, Sigma)

5. Διάλυμα ESP (0.5M EDTA pH 9.0, 1% Na-laurysarcosine, 1mg/ml Proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

6. Διάλυμα TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0)

Τεχνική της μεθόδου

- Επωάσαμε 4-5 αποικίες σε 5 ml TSB - Vortex - Επώαση overnight στους 37°C με ανακίνηση.
- Σε eppendorf βάλαμε 500 μl από το βακτηριακό εναιώρημα και φυγοκεντρήσαμε 12000 rpm για 2 min.
- Απομακρύναμε το υπερκείμενο - Προσθέσαμε 500 μl PIV- Φυγοκέντρηση 12000 rpm για 2 min - Απομακρύναμε το υπερκείμενο.
- Ανασύσταση με 200 μl PIV.
- Vortex - Βάλαμε 5 μl από το εναιώρημα σε κυβέττα μίας χρήσης που περιέχει 1 ml PIV και καλύψαμε την κυβέττα με parafilm.
- Έγινε φωτομέτρηση στα 620 nm χρησιμοποιώντας ως τυφλό κυβέττα που περιέχει 1 ml PIV. Η οπτική απορρόφηση (OD_{620}) πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.15.
- Στο εναιώρημα του βήματος 4 προσθέσαμε PIV σύμφωνα με τον τύπο: Όγκος PIV= (40 x OD_{620} x 210) – 210.
- Σε κενό eppendorf βάλαμε 200 μl από το εναιώρημα (μετά από Vortex) και 200 μl low melting agarose - Vortex - Σε γυάλινη πλάκα διαστάσεων (20 cm x 20 cm) καλυμμένη με parafilm ρίξαμε σταγόνες 20 μl, με προσοχή να μην έχουν φυσαλίδες και καλύψαμε με αντικειμενοφόρο πλάκα, ώστε οι σταγόνες να πάρουν τη μορφή δίσκου.
- Τοποθετήσαμε την πλάκα στους -20°C για 5 min.

- Κατόπιν αφήσαμε την πλάκα για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαιρέσαμε προσεκτικά τις αντικειμενοφόρους πλάκες και με κρίκο ρίξαμε τα δισκάκια σε σωληνάριο που περιέχει 1 ml EC lysis solution. Επωάσαμε στους 37°C για 5 ώρες.
- Απορρίψαμε το EC lysis solution και προσθέσαμε 1 ml ESP που περιέχει πρωτεϊνάση K. Επωάσαμε στους 50°C overnight (τουλάχιστον για 17 ώρες).
- Απορρίψαμε το ESP. Προσθέσαμε 13 ml TE και πλύναμε τα δισκάκια με ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίψαμε το TE, προσθέσαμε άλλα 13 ml TE και επαναλάβαμε τη διαδικασία του πλυσίματος 5 φορές. Ο στόχος μας είναι η απομάκρυνση της πρωτεϊνάσης K.
- Μετά τα πλυσίματα τα δισκάκια αποθηκεύτηκαν σε 1 ml TE στους 4°C.

2.7.2 Πέψη με περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο

Υλικά

- Restriction buffer:
  1. buffer 10x: 10 μl/ disc
  2. b-mercaptoehanole: 0.042 μl/ disc
  3. dH20: 90 μl/ disc
- Restriction mix:
  1. buffer 10x: 4.5 μl/ disc
  2. b-mercaptoehanole: 0.0189 μl/ disc
  3. dH20: 38.5 μl/ disc SmaI: 20 U/ disc
- Buffer ηλεκτροφόρησης:
  1. 125 ml 10xTBE buffer + dH20 έως τελικό όγκο 2,5 lt.

Τεχνική της μεθόδου

- Μοιράσαμε σε eppendorfs 100 μl restriction buffer
- Βάλαμε 1 δισκάκι αγαρόζης σε κάθε eppendorf
- Αφήσαμε 1 ώρα σε υδατόλουτρο 25°C
- Έγινε αναρρόφηση του υγρού από τα eppendorfs με τα δισκάκια

- Μοιράσαμε στα eppendorfs από 45 μl restriction mix
- Overnight υδατόλουτρο 25°C
- Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματίστηκε προσθέτοντας 4 μL loading buffer
- Φτιάξαμε το gel : 150 ml buffer + 1.5 gr agarose
- Φορτώσαμε στο gel τα δισκάκια- κλείσαμε τα πηγαδάκια με αγαρόζη
- Φορτώσαμε το gel στο μηχάνημα υπό ηλεκτρικό πεδίο για 23 ώρες. Χρησιμοποιήθηκε το εξής πρόγραμμα:

  Αρχικός χρόνος: 5 sec

  Τελικός χρόνος: 5 sec

  Χρόνος ηλεκτροφόρησης: 23 ώρες

  Γωνία: 120°

  Δυναμικό πεδίου: 6 V/cm

  Ένταση ηλεκτρικού ρεύματος: 120 mA
- Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η συσκευή PFGE CHEF DR III apparatus (Bio-Rad).
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης υπέστη χρώση σε 500 mL dH2O με 25 μL ethidium bromide (5 mg/mL, Sigma) και ήπια ανάδευση για 20 λεπτά.
- Ακολούθησε φωτογράφιση με UV

2.8 Πολυτοπική νουκλεοτιδική ανάλυση- Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Η MLST αποτελεί μια από τις βασικότερες μεθόδους μοριακής τυποποίησης του *S. aureus*, η οποία βασίζεται στη σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων 450-500bp επτά διατηρημένων, housekeeping γονιδίων του *S. aureus*:

1. *arcC* (Carbamate kinase)
2. *aroE* (Shikimate dehydrogenase)
3. *glpF* (Glycerol kinase)
4. *gmk* (Guanylate kinase)
5. *pta* (Phosphate acetyltransferase)
6. *tpi* (Triosephosphate isomerase)

7. *yqi* (Acetyle coenzyme A acetyltransferase)

Βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και η δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων σε διεθνή βάση με τη χρήση διαδικτυακών προγραμμάτων (eBURST) για τον καθορισμό της συγγένειας μεταξύ κλώνων σε διάφορες χώρες. Στα μειονεκτήματά της περιλαμβάνονται η χρονοβόρα τεχνική και το υψηλό κόστος.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του κάθε γονιδίου συγκρίνεται με αλληλουχίες αναφοράς και ανάλογα με τις διαφορές τους (πολυμορφισμούς), χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό, που αναφέρεται στο αντίστοιχο αλληλόμορφο. Έτσι, προκύπτει ένας επταψήφιος αριθμός (allelic profile), χαρακτηριστικός για κάθε στέλεχος. Ο αριθμός αυτός υποβάλλεται στη βάση δεδομένων του διαδικτύου (www.mlst.net) και προκύπτει ο τύπος ST στον οποίο αντιστοιχεί. Στελέχη με το ίδιο allelic profile ανήκουν στον ίδιο κλώνο, ενώ στελέχη που έχουν ίδια τα πέντε από τα επτά αλληλόμορφα, ανήκουν στο ίδιο σύμπλεγμα κλώνων (Clonal Complex) (238).

Στη μελέτη μας, πραγματοποιήθηκε MLST σε αντιπροσωπευτικά στελέχη με βάση το φαινότυπο αντοχής στα αντιβιοτικά και τους τύπους PFGE. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα eBURST (http://eburst.mlst.net) προκειμένου να καθοριστούν τα κλωνικά συμπλέγματα.

2.9 Στατιστική ανάλυση

Για τις κατηγορικές μεταβλητές, εφαρμόστηκαν οι δοκιμασίες χ^2 ή two-tailed Fisher's exact test και υπολογίστηκαν τα *p* values και odds ratios. Για τις συνεχείς μεταβλητές, η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε με τη χρήση της δοκιμασίας Mann–Whitney. Οι τάσεις σε ότι αφορά την αντοχή στα αντιμικροβιακά και στους τύπους κατά MLST αναλύθηκαν με τη χρήση της δοκιμασίας χ^2 chi square for trend. Το όριο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως *p* value <0.05. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού Graphpad version 9.1.0.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Κατά την διάρκεια της τετραετίας 2015 έως 2018, απομονώθηκαν 139 στελέχη χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου από παιδιά και εφήβους που νοσηλευτήκαν με διεισδυτικές και μη διεισδυτικές λοιμώξεις στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 77 αγόρια και 62 κορίτσια. Η πλειοψηφία των στελεχών ήταν MSSA (123 στελέχη, 88.5%) και 16 ήταν MRSA (11.5%). Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν τα 3.8 έτη (διάμεσος 2.02 έτη). Τα χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά 139 στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από παιδιά και εφήβους.

Χαρακτηριστικά	N=139 (%)
Φύλο (άρρεν)	77 (55.4)
Διάμεση ηλικία, (εύρος)	2.0έτη (1ημέρα-17έτη)
Διάρκεια νοσηλείας σε ημέρες, (εύρος)	7.5 (1-70)
Νοσηλεία στη ΜΕΘΠ	6 (4.3)
Περίοδος Α	60 (43.2)
Περίοδος Β	79 (56.8)
Κλινικές εκδηλώσεις	
SSTI	94 (67.7)
TMD	23 (16.5)
INV	22 (15.8)
Είδος λοίμωξης	
CA	102 (73.4)
COHA	17 (12.2)
HA	20 (14.4)

Περίοδος Α: 2015-2016, Περίοδος Β: 2017-2018. CA: Λοιμώξεις κοινότητας, HA: νοσοκομειακές λοιμώξεις, COHA: νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα

3.2 Κλινικές εκδηλώσεις

Ποσοστό 67.7% των στελεχών (94/136) απομονώθηκαν από λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων ενώ οι διεισδυτικές λοιμώξεις (22/139, 15.8%) και οι λοιμώξεις διαμεσολαβούμενες από τοξίνη (TMD) ήταν σπανιότερες (23, 16.5%). Πνευμονία (9/22), βακτηριαιμία (4/22) και οστεοαρθρίτιδα (6/22) ήταν οι συχνότερες διεισδυτικές λοιμώξεις. Τα περισσότερα στελέχη ανήκαν σε στελέχη της κοινότητας (CA), ενώ τα νοσοκομειακά στελέχη και τα νοσοκομειακά στελέχη με έναρξη στην κοινότητα ήταν λιγότερο συχνά [CA

(102/139, 73.4%), HA (20/139,14.4%) και COHA 17/139; 12.2%, αντίστοιχα]. Συνολικά 52 στελέχη ανήκαν σε παιδιά με χρόνια νοσήματα ή παρατεταμένη ενδονοσοκομειακή νοσηλεία όπως νεογνά (N=38), παιδιά με ινοκυστική νόσο (N=7), παιδιά με νοσηλεία στην ΜΕΘΠ (N=6) και σε παιδιά με κακοήθειες (N=1). Όλες οι λοιμώξεις διαμεσολαβούμενες από τοξίνη προκλήθηκαν από στελέχη MSSA και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική υπεροχή των MSSA στελεχών κατά τη χρονική περίοδο 2017-2018. Στον πίνακα 2 παρατίθενται τα κλινικά χαρακτηριστικά με βάση το φαινότυπο αντοχής στην μεθικιλλίνη. Τα νοσοκομειακά στελέχη απομονώθηκαν από παιδιά και εφήβους με μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας (Πίνακας 3).

Πίνακας 2. Σύγκριση στελεχών MRSA και MSSA ως προς τα κλινικά τους χαρακτηριστικά.

	MSSA	MRSA	OR 95% CI	*p* value
	n=123(%)	n=16 (%)		
Φύλο (άρρεν)	66 (53.6)	11 (68.7)	1.9 (0.68-5.14)	0.29
Διάμεση ηλικία, (εύρος)	1.9y (1d-17y)	2.0y (4d-16y)		0.56 [a]
Διάρκεια νοσηλείας σε ημέρες, (εύρος)	7.9 (1-70)	8.81 (3-21)		0.87[a]
Οκτώβρης-Μάρτιος	53 (43)	6 (37.5)	1.26 (0.43-3.69)	0.79
Απρίλιος-Σεπτέμβριος	70 (56.9)	10 (62.5)		
Νοσηλεία στη ΜΕΘΠ	5 (4)	1 (6.2)	1.6 (0.12-13.40)	0.52
Περίοδος Α	49 (39.8)	11 (68.8)	3.3 (1.18-8.96)	**0.03**
Περίοδος Β	74 (60.2)	5 (31.2)		
SSTI	80 (65)	14 (87.5)	3.7 (0.91-17.19)	0.09
TMD	23 (18.7)	0 (0)	0.00 (0.00-1.13)	**0.00**
INV	20 (16.2)	2 (12.5)	0.73 (0.15-3.30)	>0.99
Είδος λοίμωξης				
CA	88 (71.5)	14 (87.5)	2.78 (0.66-12.79)	0.23
COHA	17 (13.8)	0 (0)	0 (0-1.36)	0.21
HA	18 (14.6)	2 (12.5)	0.8 (0.17-3.82)	>0.99

[a] Εφαρμόστηκε Mann- Whitney *U* test για να αναλυθούν οι διαφορές των ομάδων. ΜΕΘΠ: Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Παίδων, Περίοδος Α: 2015-2016, Περίοδος Β: 2017-2018. CA: λοιμώξεις κοινότητας, HA: νοσοκομειακές λοιμώξεις, COHA: νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα. OR>1 υποδηλώνει υψηλότερα ποσοστά στα MSSA στελέχη.

Πίνακας 3. Σύγκριση στελεχών CA, COHA και HA ως προς τα κλινικά τους χαρακτηριστικά.

	CA n=102 (%)	**HA/COHA** n=37 (%)	**OR 95% CI**	**p value**
Φύλο (άρρεν)	61 (59.8)	16 (43.2)	1.95 (0.92-4.32)	0.08
Διάμεση ηλικία, (εύρος)	1.8y (4d-16y)	2.2y (1d-17y)		0.46[a]
Διάρκεια νοσηλείας σε ημέρες, (εύρος)	7 (1-29)	11 (1-70)		**0.02** [a]
Νοσηλεία στη ΜΕΘΠ	3 (2.9)	2 (5.4)	0.02 (0.002-0.25)	**<0.0001**
Περίοδος A	44 (43.1)	16 (43.2)	1.00 (0.47-2.14)	0.57
Περίοδος B	58 (56.9)	21 (56.8)		
Κλινικές εκδηλώσεις				
SSTI	73 (71.5)	21 (56.8)		
TMD	19 (18.6)	4 (10.8)	**4.41 (1.71-10.79)**	**0.0012**
INV	10 (9.8)	12 (32.4)		

[a]Εφαρμόστηκε Mann- Whitney *U* test για να αναλυθούν οι διαφορές των ομάδων. ΜΕΘΠ: Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Παίδων, d: ημέρες; y: χρόνια, Περίοδος A: 2015-2016, Περίοδος B: 2017-2018. CA: λοιμώξεις κοινότητας, HA: νοσοκομειακές λοιμώξεις, COHA: νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα. OR>1 υποδηλώνει υψηλότερα ποσοστά στα CA στελέχη.

3.3 Έκβαση

Η μέση διάρκεια νοσηλείας ήταν 7.5 ημέρες (1-70 ημέρες). Παιδιά με λοιμώξεις από στελέχη MRSA δεν διέφεραν ως προς την διάρκεια νοσηλείας σε σχέση με MSSA στελέχη (p 0.87). Κατά το διάστημα παρακολούθησης δεν διαπιστώθηκαν θάνατοι.

3.4 Αντοχή στα αντιμικροβιακά

Από τα 139 στελέχη *S. aureus*, συνολικά 16 στελέχη (11.5%) ήταν ανθεκτικά στην μεθικιλλίνη και 123 (88.5%) ήταν MSSA. Ποσοστό 93.5% των στελεχών ήταν ανθεκτικά στην πενικιλλίνη, 35.9% στο φουσιδικό οξύ, 7.2% στη μουπιροσίνη, 22.3% στην τομπραμυκίνη, 18.7% στην ερυθρομυκίνη, 16.5% στην κλινδαμυκίνη και 9.3% στην τετρακυκλίνη. Ανάμεσα στα 26 στελέχη που παρουσίαζαν αντοχή στην ερυθρομύκινη, ποσοστό 53.9%, 34.6% και 11.5% αντίστοιχα παρουσίαζαν φαινότυπο αντοχής $cMLS_B$, $iMLS_B$ και MS αντίστοιχα.

Η αντοχή στην κλινδαμυκίνη ήταν συχνότερη σε στελέχη MRSA σε σύγκριση με στελέχη MSSA [MRSA 37.5% vs MSSA 13.8%, OR 3.74(1.13-11.61) p 0.02] όπως και η αντοχή στην τετρακυκλίνη [MRSA 37.5% vs MSSA 5.6% , OR 9.93(2.76-36.94) p 0.001]. Τα στελέχη MRSA και MSSA δεν διέφεραν ως προς τους φαινοτύπους αντοχής $cMLS_B$ και $iMLS_B$ (OR

0.20, 95% CI 0.03-1.39, p 0.16). Παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά αντοχής στην γενταμυκίνη, σιπροφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, φωσφομυκίνη και κοτριμοξαζόλη (2,1%, 5%, 5,5%, 5,2%, 3,3% και 3,6% αντίστοιχα). Κανένα στέλεχος δεν παρουσίαζε αντοχή στην βανκομυκίνη, ριφαμπικίνη, λινεζολίδη και τεϊκοπλανίνη. Όλα τα στελέχη που ήταν φαινοτυπικά ανθεκτικά στην κεφοξιτίνη, ήταν επίσης ανθεκτικά στην οξακιλλίνη και έφεραν το γονίδιο *mecA*.

Πίνακας 4. Αντοχή στελεχών MRSA και MSSA σε συνήθη αντιμικροβιακά.

	Total N (%)	**MRSA (%) N: 16**	**MSSA (%) N123**	**OR (95% CI)**	**p value**
Penicillin G	130 (93.5)	16(100)	114 (92.6)	NA	0.59
Erythromycin	26 (18.7)	6(37.5)	20 (16.2)	3.09(0.96-9.26)	0.07
Clindamycin	23 (16.5)	6 (37.5)	17 (13.8)	3.74(1.13-11.61)	**0.02**
Fusidic acid	50 (35.9)	9 (56.2)	41 (33.3)	2.57(0.91-6.73)	0.09
Gentamicin	3 (2.1)	1 (6.2)	2 (1.6)	4.03(0.26-35.71)	0.30
Tobramycin	27 (22.3)	1 (7.7)	26 (24.1)	0.26(0.02-1.61)	0.29
Levofloxacin	7 (5.1)	2 (12.5)	5 (4.1)	3.31(0.60-18.36)	0.18
Rifampicin	0 (0)	0 (0)	0 (0)		>0.99
Tetracycline	13 (9.3)	6 (37.5)	7 (5.6)	9.93(2.76-36.94)	**0.001**
Tigecycline	0 (0)	0 (0)	0 (0)		>0.99
TMP/SMX*	5 (3.6)	2 (12.5)	3 (2.4)	5.71(0.93-29.23)	0.10
Nitrofurantoin	0 (0)	0 (0)	0 (0)		>0.99
Mupirocin	10 (7.2)	0 (0)	10 (8.1)	0.00(0.00-2.75)	0.60
Vancomycin	0 (0)	0 (0)	0 (0)		>0.99
Linezolid	0 (0)	0 (0)	0 (0)		>0.99
Teicoplanin	0 (0)	0 (0)	0 (0)		>0.99

TMP/SMX *: trimethoprim/sulfamethoxazole

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην αντοχή στη μεθικιλλίνη ανάμεσα σε στελέχη κοινότητας και νοσοκομειακά στελέχη [CA vs HA στελέχη OR 2.78, 95% CI (0.66-12.79), p

0.17]. Τα στελέχη κοινότητας σε σύγκριση με τα νοσοκομειακά στελέχη δεν παρουσίασαν διαφορές σε σχέση με την ευαισθησία τους στα αντιμικροβιακά. Στον πίνακα 5 φαίνονται οι αντιμικροβιακές αντοχές στελεχών κοινότητας και νοσοκομειακών στελεχών.

Πίνακας 5. Αντοχή στελεχών CA,COHA και HA σε συνήθη αντιμικροβιακά.

	Total N (%)	**CA (%) N: 102**	**COHA/HA (%) N:37**	**OR (95% CI)**	**p value**
Penicillin G	130 (93.5)	94 (92.1)	36 (97.2)	3.06 (0.36-25.37)	0.44
Erythromycin	26 (18.7)	17 (16.7)	9 (24.3)	1.60 (0.64-4.00)	0.33
Clindamycin	23 (16.5)	16 (15.6)	7 (18.9)	1.25 (0.47-3.34)	0.79
Fusidic acid	50 (35.9)	37 (36.3)	13 (35.1)	0.95 (0.43-2.08)	1
Gentamicin	3 (2.1)	1 (0.9)	2 (5.4)	5.77 (0.50-65.62)	0.17
Tobramycin	27 (22.3)	19 (18.6)	8 (21.6)	1.04 (0.40-2.67)	1
Levofloxacin	7 (5.1)	5 (4.9)	2 (5.4)	1.12 (0.20-6.09)	1
Rifampicin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	>0.99
Tetracycline	13 (9.3)	10 (9.8)	3 (8.1)	0.81 (0.21-3.12)	1
Tigecycline	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	>0.99
TMP/SMX*	5 (3.6)	2 (1.9)	3 (8.1)	4.41 (0.70-27.53)	0.11
Nitrofurantoin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	>0.99
Mupirocin	10 (7.2)	7 (6.8)	3 (8.1)	1.19 (0.29-4.89)	1
Vancomycin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	>0.99
Linezolid	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	>0.99
Teicoplanin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	>0.99

TMP/SMX *: trimethoprim/sulfamethoxazole. CA: λοιμώξεις κοινότητας, HA: νοσοκομειακές λοιμώξεις, COHA: νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα.

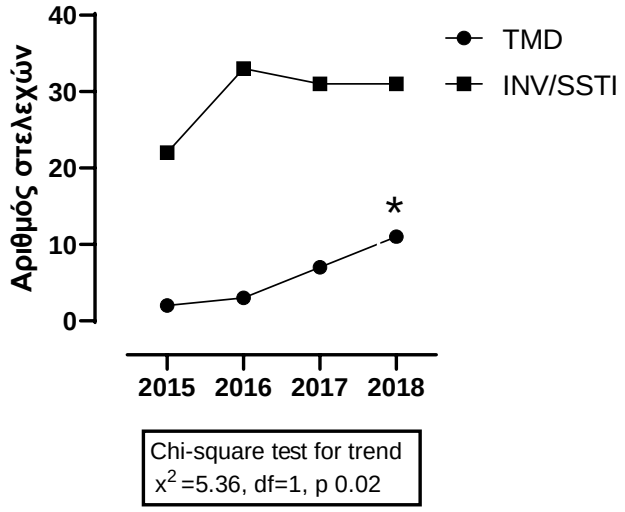
3.5 Επιδημιολογικά δεδομένα

3.5.1 Κλινικές εκδηλώσεις

Κατά το χρονικό διάστημα 2015-2018, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των περιπτώσεων λοιμώξεων *S. aureus* διαμεσολαβούμενων από τοξίνη, με κλινική εκδήλωση

του σταφυλοκοκκικού αποφολιδωτικού συνδρόμου (SSSS) όπως φαίνεται στην εικόνα 1 (x^2 for trend OR 5.36, df1, p 0.02).

Εικόνα 1. Κλινικές εκδηλώσεις λοιμώξεων από *S. aureus* κατά την χρονική περίοδο 2015 έως 2018.

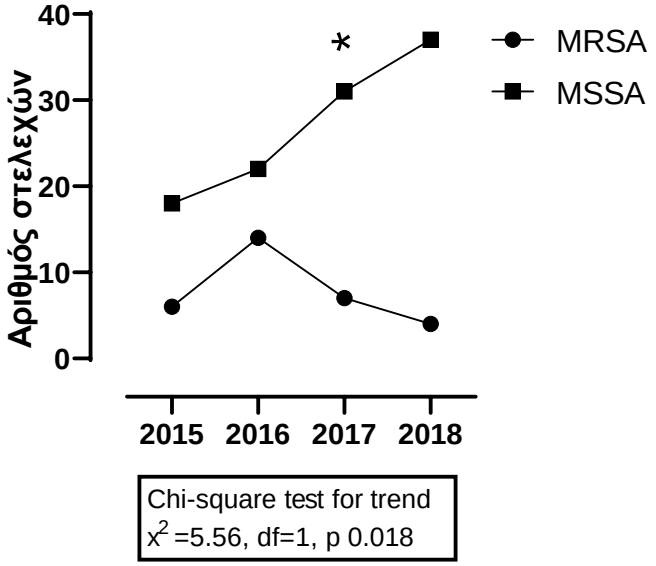


TMD: toxin mediated disease, INV: invasive, SSTI: skin and soft tissue infections

3.5.2 Αντιμικροβιακές αντοχές

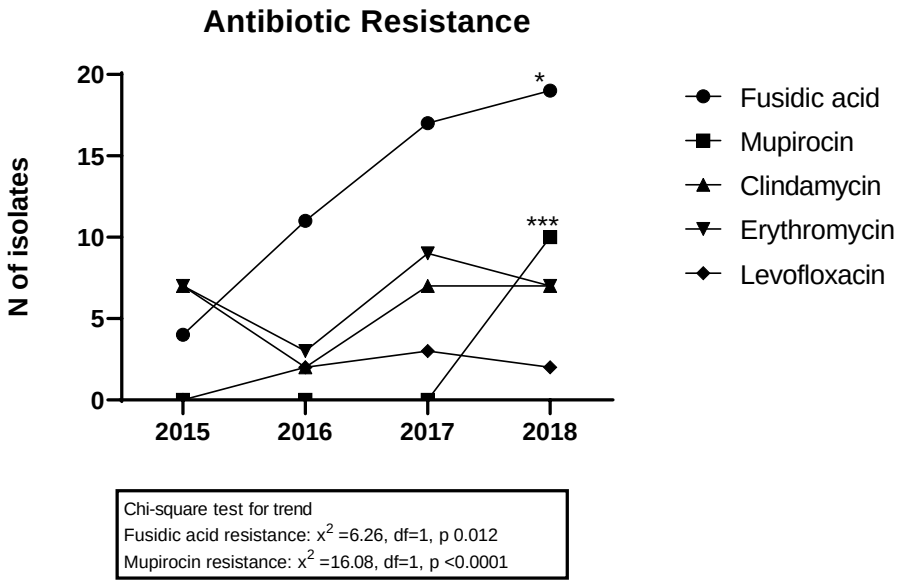
Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων από στελέχη MSSA [(2017-2018) vs (2015-2016) OR 3.32 95%CI (1.18-8.96) p 0.03, x^2 5.56 df:1, p 0.02]. Μετά από μια κορύφωση κατά το έτος 2016, η συχνότητα των λοιμώξεων από στελέχη MRSA παρουσίασε πτωτικές τάσεις (Εικόνα 2), [18.3% κατά τα έτη 2015-2016 σε 6.3% κατά τα έτη 2016-2017, p 0.018].

Εικόνα 2. Επίπτωση λοιμώξεων από *S. aureus* κατά την χρονική περίοδο 2015 έως 2018.



Παράλληλα, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της αντοχής σε φουσιδικό οξύ και μουπιροσίνη (φουσιδικό οξύ, x^2 test for trend, p 0.01; μουπιροσίνη x^2 test for trend, p <0.0001). Οι αυξητικές τάσεις της αντοχής της μουπιροσίνης συσχετίσθηκαν με αύξηση των ανθεκτικών στη μουπιροσίνη στελεχών MSSA (p <0.0001). Παρατηρήθηκε επίσης αύξηση της αντοχής σε κλιναδαμυκίνη, τομπραμυκίνη, ερυθρομυκίνη και λεβοφλοξασίνη αν και όχι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3, πίνακας 6).

Εικόνα 3. Αντιμικροβιακές αντοχές κατά τη διάρκεια της περιόδου μελέτης



Πίνακας 6. Σύγκριση στελεχών περιόδου Α και Β ως προς την αντοχή τους σε αντιμικροβιακά.

	Total N (%)		ΠΕΡΙΟΔΟΣ Α		ΠΕΡΙΟΔΟΣ Β		OR 95% CI	p value
	A	**E**	**A**	**E**	**A**	**E**		
Methicillin	16 (11.5)	123 (88.5)	11	49	5	74	**3.32 (1.18-8.96)**	**0.03**
Penicillin G	130 (93.5)	9 (6.5)	57	3	73	6	1.56 (0.41-5.87)	0.73
Erythromycin	26 (18.7)	113 (81.3)	10	50	16	63	0.78 (0.32-1.86)	0.66
Clindamycin	23 (16.6)	116 (83.4)	9	51	14	65	0.81 (0.34-2.12)	0.81
Fusidic acid	50 (36)	89 (64.0)	15	45	35	44	**0.41 (0.19-0.84)**	**0.02**
Gentamicin	3 (2.2)	136 (97.8)	2	58	1	78	2.69 (0.3-39.41)	0.57
Tobramycin	27 (19.4)	94 (80.6)	11	49	16	45	0.63 (0.27-1.49)	0.38
Levofloxacin	7 (5.1)	130 (94.9)	2	58	5	72	0.50 (0.09-2.49)	0.69
Rifampicin	0 (0)	139 (100)	0	60	0	79		>0.99
Tetracycline	13 (9.3)	126 (90.7)	9	51	4	75	3.30 (0.9-10.06)	0.07
Tigecycline	0 (0)	137 (100)	0	59	0	78		>0.99
Trimethoprim/ Sulfonamides	5 (3.6)	134 (96.4)	3	57	2	77	2.02 (0.4-11.65)	0.65
Nitrofurantoin	0 (0)	58 (100)	0	40	0	18		>0.99
Mupirocin	10 (7.2)	129 (92.8)	0	60	10	69	**0.00(0.00-0.41)**	**0.005**
Vancomycin	0 (0)	139 (100)	0	60	0	79		>0.99
Linezolid	0 (0)	139 (100)	0	60	0	79		>0.99
Teicoplanin	0 (0)	139 (100)	0	60	0	79		>0.99

Περίοδος Α: 2015-2016, Περίοδος Β: 2017-2018. Α: ανθεκτικά, Ε: ευαίσθητα. OR>1 υποδηλώνει υψηλότερα ποσοστά κατά την περίοδο Α.

Πίνακας 7. Φαινότυποι αντοχής στο χρόνο.

	Total N		2015		2016		2017		2018		Chi square for trend	p value
	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E		
Penicillin G	39	1	6	0	11	0	7	0	15	1	1.13	0.28
Erythromycin	10	30	3	3	1	10	2	5	5	12	0.01	0.98
Clindamycin	10	30	3	3	1	10	2	5	4	12	0.16	0.68
Fusidic acid	21	19	0	6	5	6	5	2	11	5	7.54	**0.006**
Gentamicin	0	40	0	6	0	11	0	7	0	16	NA	
Tobramycin	14	18	1	5	7	4	5	2	1	7	0.23	0.62
Levofloxacin	1	38	0	6	1	10	0	7	0	15	0.52	0.46
Rifampicin	0	40	0	6	0	11	0	7	0	16	NA	
Tetracycline	2	38	0	6	2	9	0	7	0	16	NA	
Tigecycline	0	40	0	6	0	11	0	7	0	16	NA	
Trim/Sulfa	0	40	0	6	0	11	0	7	0	16	NA	
Nitrofurantoin	0	16	0	5	0	5	0	0	0	6	NA	
Mupirocin	10	30	0	6	0	11	0	7	10	6	14.79	**0.0001**
Vancomycin	0	40	0	6	0	11	0	7	0	16	NA	
Linezolid	0	40	0	6	0	11	0	7	0	16	NA	
Teicoplanin	0	40	0	6	0	11	0	7	0	16	NA	

A: ανθεκτικά, E: ευαίσθητα

3.6 Μοριακά χαρακτηριστικά στελεχών *S. aureus*

3.6.1 Λοιμογόνα γονίδια

Όλα τα στελέχη (N=139) εξετάστηκαν για την ύπαρξη λοιμογόνων γονιδίων. Από αυτά, 13 στελέχη (9.4%) ήταν *lukS/lukF-PV* θετικά, 27 (19.4%) *eta* θετικά, έξι (4.3%) *etb* θετικά, 13 (9.4%) *tst* θετικά, 125 (89.9%) *fnbA* θετικά και 21 (15.1%) *fnbB* θετικά. Τα στελέχη MRSA παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά παρουσίας των γονιδίων *lukS/lukF-PV* και *tst* σε σύγκριση με τα MSSA ενώ τα MSSA είχαν υψηλότερα ποσοστά γονιδίων *eta* (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Μοριακά χαρακτηριστικά στελεχών MSSA και MRSA κατά το χρονικό διάστημα 2015-2018.

	Total n=139 (%)	**MRSA** n=16 (%)	**MSSA** n=123(%)	**OR 95% CI**	**p value**
Virulence genes					
lukS/F	13 (9.4)	5 (31.2)	8 (6.5)	6.53 (1.93-22.7)	**0.001**
Eta	27 (19.4)	0 (0)	27 (21.9)	0.00 (0.00-0.91)	**0.03**
Etb	6 (4.3)	0 (0)	6 (4.8)	0.00 (0.00-4.44)	0.36
Tst	13 (9.4)	4 (25)	9 (7.3)	4.22 (1.26-14.6)	**0.04**
FnbA	125 (89.9)	13 (81.2)	112 (91)	0.42 (0.11-1.58)	0.22
FnbB	21 (15.1)	0 (0)	21 (17)	0.00 (0.00-1.28)	0.07

OR>1 υποδηλώνει υψηλότερα ποσοστά στα MRSA στελέχη.

Τα ποσοστά ανίχνευσης του γονιδίου *eta* ήταν ψηλότερα σε στελέχη από λοιμώξεις διαμεσολαβούμενες από τοξίνη σε σύγκριση με τα στελέχη διεισδυτικών λοιμώξεων και λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων (OR 3.5, 95% CI 1.36-9.29, p 0.01, Πίνακας 9). Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά φορίας λοιμογόνων γονιδίων μεταξύ των στελεχών κοινότητας και νοσοκομειακών στελεχών (Πίνακας 10).

Πίνακας 9. Μοριακά χαρακτηριστικά στελεχών *S. aureus* από λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων, διεισδυτικές λοιμώξεις και λοιμώξεις διαμεσολαβούμενες από τοξίνη.

	Total N=139 (%)	**SSTI** N=94 (%)	**INV** N=22(%)	**TMD** N=23(%)	**p value**
Virulence genes					
lukS/F	13 (9.4)	8 (8.5)	4 (18.1)	1 (4.3)	0.24
Eta	27 (19.4)	17 (18.0)	1 (4.5)	9 (39.1)	**0.01**
Etb	6 (4.3)	3 (3.2)	0 (0)	3 (13.0)	**0.06**
Tst	13 (9.4)	11 (11.7)	2 (9)	0 (0)	0.41
fnbA	125 (89.9)	85 (90.4)	18 (81.8)	22 (95.6)	0.29
fnbB	21 (15.1)	13 (13.8)	6 (27.2)	2 (8.6)	0.18

Πίνακας 10. Μοριακά χαρακτηριστικά στελεχών CA, COHA και HA.

	CA n=102 (%)	**HA/COHA** n=37 (%)	**OR 95% CI**	**p value**
Virulence genes				
lukS/F	9 (8.8)	4 (10.8)	0.79 (0.22-2.47)	0.72
Eta	20 (19.6)	7 (18.9)	1.04 (0.40-2.65)	0.92
Etb	4 (3.9)	2 (5.4)	0.71 (0.16-3.89)	0.70
Tst	10 (9.8)	3 (8.1)	1.23 (0.32-4.36)	0.76
fnbA	92 (90.2)	33 (89.2)	1.11 (0.36-3.70)	0.86
fnbB	13 (12.7)	8 (21.6)	0.52 (0.20-1.42)	0.19

CA: λοιμώξεις κοινότητας, HA: νοσοκομειακές λοιμώξεις, COHA: νοσοκομειακές λοιμώξεις με έναρξη στην κοινότητα.

Πίνακας 11. Μοριακά χαρακτηριστικά ανά χρονική περίοδο

	Period A	Period B	OR 95%CI	*p* value
lukS/F	5 (8.3)	8 (10.1)	0.80(0.28-2.50)	0.77
Eta	14 (23.3)	13 (16.4)	1.545(0.66-3.70)	0.38
etb	0 (0)	6 (7.9)	0.80(0.28-2.50)	0.18
tst	5 (8.3)	8 (10.1)	0.80(0.28-2.50)	0.77
fnbA	52 (86.7)	73 (92.4)	0.53(0.17-1.72)	0.39
fnbB	7 (11.7)	14 (17.7)	0.61(0.24-1.54)	0.35

Pos: θετικά, neg: αρνητικά, OR>1 υποδηλώνει υψηλότερα ποσοστά κατά την περίοδο B.

3.6.2 PFGE ταξινόμηση

Τα στελέχη MSSA παρουσίασαν γενετική ποικιλία με την PFGE και ταξινομήθηκαν σε 20 τύπους κάθε ένας από τους όποιους περιελάμβανε 1 έως 40 στελέχη. Ανιχνευτήκαν δυο κυρίαρχοι κλώνοι, ο τύπος 1 με 10 υποτύπους (ST121) που περιελάμβανε 40 στελέχη και ο τύπος 2 με 7 υποτύπους και 16 στελέχη. Συνολικά, 16 PFGE τύποι συμπεριέλαβαν ένα έως 8 στελέχη MSSA ο καθένας. Επιπλέον, δύο στελέχη MSSA ταξινομήθηκαν στους PFGE τύπους C (ST80) και H (ST225). Τα στελέχη MRSA ανήκαν σε 4 PFGE τύπους: στον τύπο A ανήκαν 4 στελέχη (ST30), στον τύπο B: 4 στελέχη (ST239), στον τύπο C: 5 στελέχη (ST80) και στον τύπο H: 3 στελέχη (ST225).

3.6.3 MLST (Multilocus Sequence Typing)

Με την MLST μελετήθηκαν 58 αντιπροσωπευτικά στελέχη εκ των οποίων όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από παιδιά με λοιμώξεις διαμεσολαβούμενες από τοξίνη (SSSS). Συνολικά, ανιχνεύθηκαν 5 MLST τύποι (Εικόνα 7). Ανάμεσα στα στελέχη που απομονώθηκαν από SSSS, ο τύπος PFGE 1, ST121 με την MLST ήταν ο κυρίαρχος τύπος (13/23, 56.5%, p 0.002).

Στη μελέτη μας, 40 στελέχη ανήκαν στον τύπο ST121, εκ των οποίων όλα ήταν MSSA και στην πλειοψηφία τους CA (31/40, 77.5%). Συγκριτικά με τα άλλα στελέχη, ο ST121 παρουσίαζε υψηλά επίπεδα αντοχής στο φουσιδικό οξύ (80%), στην τομπραμυκίνη (35%), μουπιροσίνη (25%) και στην κλινδαμυκίνη (25%), σπανίως έφερε γονίδια PVL και *tst* (3/40 and 0/40 αντίστοιχα) αλλά ήταν θετικός για γονίδια *eta* ή/και *etb* (*eta* 27/40, *etb* 6/40, *eta* και *etb* 4/40) καθώς και γονίδια που επιτρέπουν την προσκόλληση στο επιθήλιο (*fnbA* 40/40). Ο PFGE τύπος 1 προκαλούσε κυρίως SSTIs (26/40) και SSSS (13/40) ενώ καταγράφηκε μία περίπτωση διεισδυτικής νόσου. Συγκριτικά με τους άλλους τύπους, η αντοχή στη μουπιροσίνη και η παρουσία των γονιδίων *eta/etb* ήταν αποκλειστικά συνδεδεμένη με τον τύπο 1 ($p<0.0001$).

Ο κλώνος ST80 ανήκε στον PFGE τύπο C, ήταν PVL-θετικός (100%,6/6), *mecA*-θετικός (83.30%, 5/6), *fnbA*-θετικός (83.3%, 5/6), αρνητικός για επιδερμολυσίνες τοξίνες και προκαλούσε κυρίως λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων (66.7% 4/6). Τα στελέχη ST80

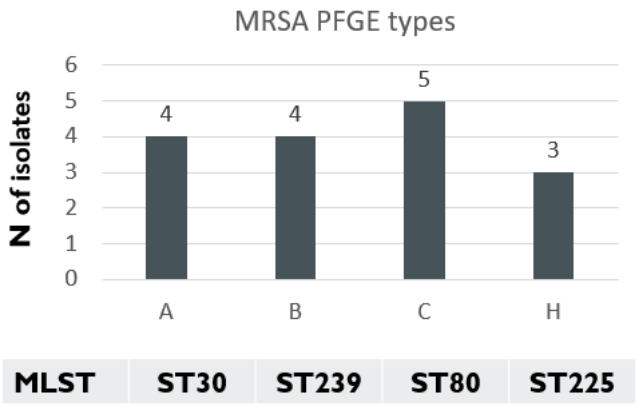
παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα αντοχής στην τετρακυκλίνη (5/6,83.3%) και στο φουσιδικό οξύ (3/6,50%). Παρατηρήθηκε μια σημαντική πτώση ποσοστών των κλώνων ST80 κατά την διάρκεια της μελέτης [Περίοδος Α: 5 στελέχη (8.3%), Περίοδος Β: 1 στέλεχος (1.2%), p 0.08].

Τα στελέχη ST121 και ST80 δεν διέφεραν σημαντικά ως προς τις αντιμικροβιακές αντοχές αν και ο κλώνος ST80 παρουσίαζε υψηλότερη αντοχή στη μεθικιλλίνη και στην τετρακυκλίνη (ST121 *vs* ST80: methicillin, 0% *vs* 83.3%, p <0.0001; tetracycline, 5% *vs* 83.3%, p <0.0001).

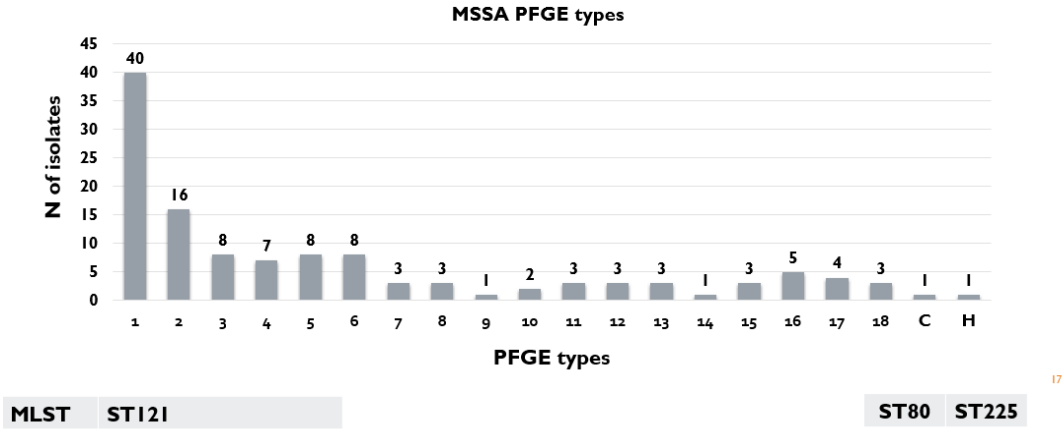
Πίνακας 12. Μοριακά χαρακτηριστικά των 58 στελεχών *S. aureus* που χαρακτηρίστηκαν κατά MLST.

N of isolates	**Pulso-type**	**ST**	**Methicillin-susceptible or resistant (N)**	**Origin (N)**	***lukS/F (%)***	***eta (%)***	***etb (%)***	***tst (%)***	***fnbA (%)***	***fnbB (%)***
40	1	ST121	MSSA (40)	CA (31) HA (4) COHA (5)	3 (7.5)	27 (67.5)	6 (15)	0 (0)	40 (100)	3 (7.5)
6	C	ST80	MRSA (5) MSSA (1)	CA (6)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (83.3)	0 (0)
4	B	ST239	MRSA (4)	CA (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	0 (0)
4	H	ST225	MRSA (3) MSSA (1)	CA (2) HA (1) COHA (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	4 (100)	0 (0)
4	A	ST30	MRSA (4)	CA (3) HA (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	3 (75)	0 (0)

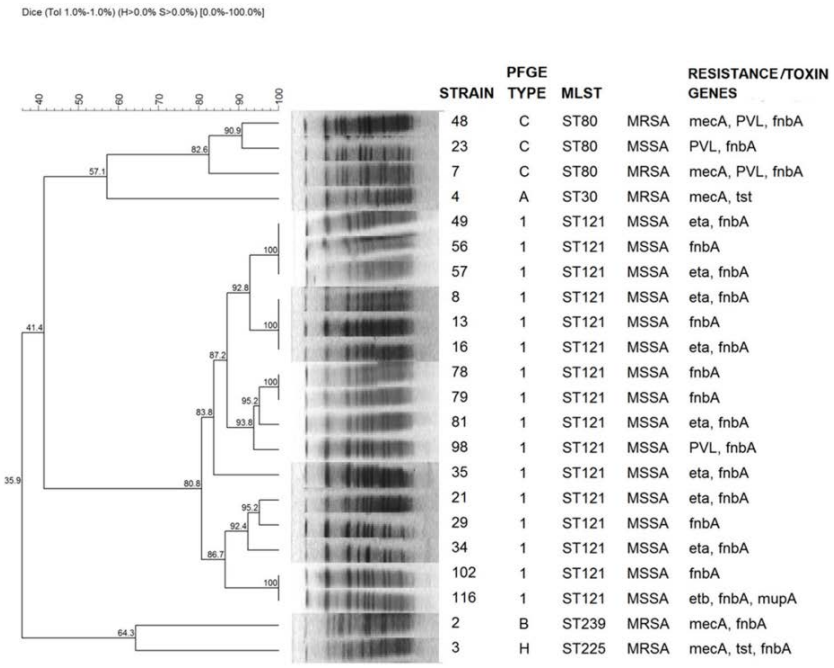
Εικόνα 4. Αποτελέσματα PFGE και MLST τυποποίησης για στελέχη MRSA



Εικόνα 5. Αποτελέσματα τυποποίησης PFGE και MLST τυποποίησης για στελέχη MSSA

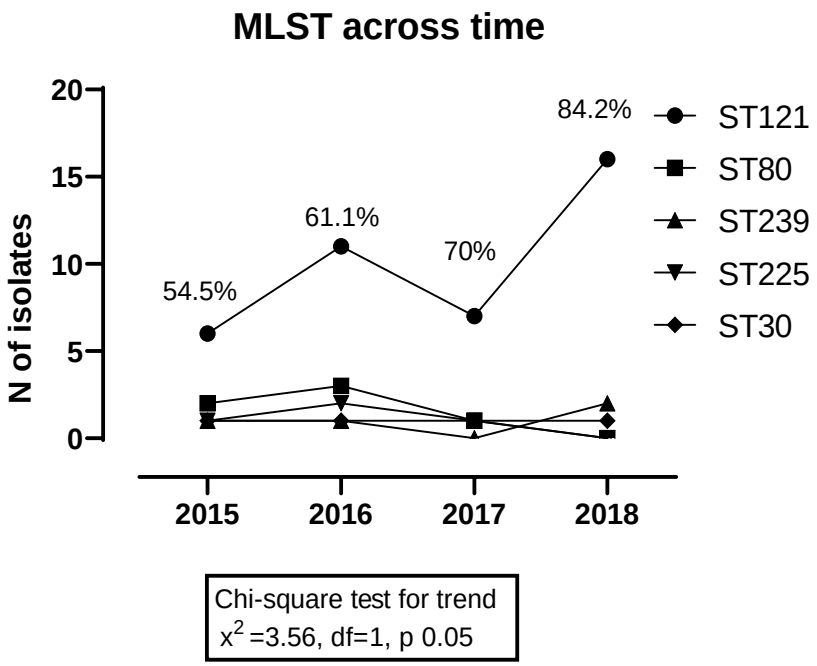


Εικόνα 6. Δενδρόγραμμα κλώνων των στελεχών *S. aureus* με PFGE και MLST



Στελέχη CA είναι οι αριθμοί 48, 23, 7, 4, 49, 56, 57, 8, 13, 16, 78, 79, 81, 98, 35, 29, 34, 116, 2 και 3, στέλεχος HA: ο αριθμός 21, στέλεχος COHA: ο αριθμός 102.

Εικόνα 7. Αποτελέσματα MLST στο χρόνο



3.6.4 Μοριακά χαρακτηριστικά στελεχών SSSS.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των στελεχών SSSS. Όλα τα στελέχη SSSS (N=23) μελετήθηκαν με PFGE και MLST. Ο PFGE τύπος 1, ST121 ήταν ο κυρίαρχος (13/23, 56.5%, p 0.002). Από τα 23 στελέχη, 9 στελέχη (39.1%) ήταν θετικά για το γονίδιο *eta*, 3 (13%) ήταν θετικά για το γονίδιο *etb* και 1 στέλεχος έφερε και τα δύο γονίδια (4.3%) *eta και etb*. Τα θετικά για *eta* ή *etb* γονίδια όλα ανήκαν στον τύπο 1 με PFGE, ST121.

Πίνακας 13. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μοριακών χαρακτηριστικών.

ST	**Total**	**Λοιμογόνα γονίδια**						**Κλινική εκδήλωση**			**Αντοχή**		
	N%	***lukS/F***	***eta****	***etb***	***tst***	***fnbA***	***fnbB***	**SSTI**	**SSSS****	**INV**	**FA**	**Tob**	**Mup***
ST121	**40(69)**	**3(7.5)**	**27(67.5)**	**6(15)**	**0(0)**	**40(100)**	**3(7.5)**	**26(65)**	**13(33)**	**1(2)**	**32(80)**	**14(35)**	**10(25)**
ST80	**6(10.3)**	**6(100)**	**0(0)**	**0(0)**	**0(0)**	**5(83.3)**	**0(0)**	**4(67)**	**0(0)**	**2(34)**	**3(50)**	**0(0)**	**0(0)**
ST239	**4(6.9)**	**0(0)**	**0(0)**	**0(0)**	**0(0)**	**3(75)**	**0(0)**	**4(100)**	**0(0)**	**0(0)**	**1(25)**	**1(25)**	**0(0)**
ST225	**4(6.9)**	**0(0)**	**0(0)**	**0(0)**	**0(0)**	**4(100)**	**0(0)**	**4(100)**	**0(0)**	**0(0)**	**4(100)**	**1(25)**	**0(0)**
ST30	**4(6.9)**	**4(100)**	**0(0)**	**0(0)**	**3(75)**	**3(75)**	**0(0)**	**4(100)**	**0(0)**	**0(0)**	**3(75)**	**0(0)**	**0(0)**

*** eta+ (ST121 vs Other MLST types)- p <0.0001; ** SSSS (ST121 vs Other MLST types)- p 0.005;* Mupirocin resistance –ST121 vs Other MLST types– p 0.02

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν για πρώτη φορά τα κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από παιδιά και εφήβους που νοσηλεύτηκαν στις κλινικές του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα στελέχη κοινότητας MSSA έχουν επικρατήσει τόσο στις διεισδυτικές όσο και στις μη διεισδυτικές λοιμώξεις και έχουν παρεκτοπίσει στελέχη MRSA. Κύριες εκδηλώσεις τους αποτελούν οι λοιμώξεις δέρματος, μαλακών μορίων και το SSSS ενώ λιγότερο συχνές είναι οι διεισδυτικές λοιμώξεις.

Στο παρελθόν, στην Ελλάδα τα στελέχη MRSA επιβάρυναν σημαντικά το σύστημα υγείας. Προηγούμενες μελέτες που διενεργήθηκαν από το 2003 έως το 2015 ανέφεραν υψηλά ποσοστά λοιμώξεων από CA-MRSA σε παιδιά τα οποία σχετίζονταν κυρίως με την εξάπλωση του PVL-θετικού, ST80 MRSA κλώνου [Πίνακας 14]. Σε μια ελληνική πολυκεντρική μελέτη 12ετίας που δημοσιεύθηκε το 2014, φάνηκε ότι ο MRSA ήταν σημαντική αιτία νοσοκομειακών και λοιμώξεων κοινότητας στα παιδιά (239). Ομοίως, το 2016 σε μια μελέτη 8 ετών που αφορούσε περιστατικά πνευμονίας κοινότητας σε παιδιά, ο MRSA αφορούσε το 75% των περιπτώσεων (240). Τα δεδομένα αυτά συμπίπτουν με τα δικά μας ιστορικά δεδομένα από την περίοδο 2008-2014 όπου κυρίαρχη θέση με ποσοστό 35% είχαν στελέχη MRSA που ανήκαν στον κλώνο ST80 (Εικόνα 9).

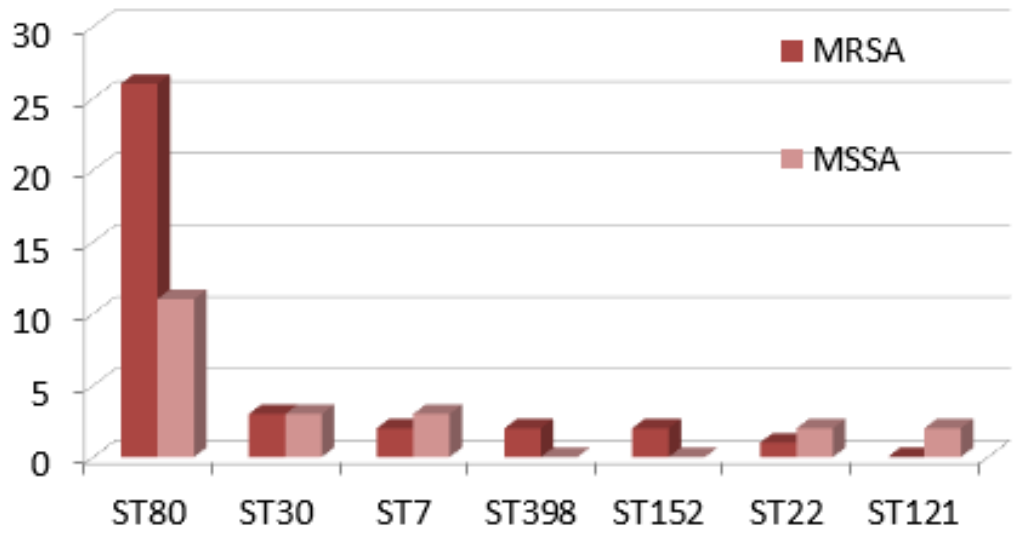
Πίνακας 14. Ανασκόπηση αποτελεσμάτων μοριακού χαρακτηρισμού στελεχών *S. aureus* άλλων γεωγραφικών περιοχών στην Ελλάδα.

Συγγραφείς	**Έτος**	**Τύπος Λοίμωξης**	**Πόλη**	**N**	**Περίοδος μελέτης**	**Συμπεράσματα**
Niniou et al(241)	2008	CA-MRSA	Αθήνα	198	2003-2005	Αύξηση των CA-MRSA λοιμώξεων στα παιδιά λόγω εξάπλωσης κλώνου ST80.
Katopodis et al (242)	2010	CA- MRSA	Λάρισσα	309	2003-2009	Κυρίαρχος ο ευρωπαϊκός κλώνος ST80.
Drougka et al (239)	2014	MRSA	Αθήνα, Πάτρα, Ιωάννινα, Λάρισσα	1236	2001-2012	Κυρίαρχος ο ST80-IV που αντικατέστησε άλλους PVL-θετικούς κλώνους, επικράτηση του ST239-III στα HA-MRSA.
Kachrimanidou et al (243)	2014	MRSA	Θεσσαλονίκη	28	2010-2011	Spa t003 χαρακτήριζε τα επικρατούντα στελέχη
Doudoulakakis et al (240)	2016	Πνευμονία	Αθήνα	132	2007-2014	Κυριάρχησε ο ευρωπαϊκός ST80-IV-PVL-θετικός MRSA κλώνος.
Doudoulakakis et al (14)	2017	MUP αντοχή	Αθήνα	102	2013-2016	Ανάδυση ενός κυριάρχου MSSA κλώνου ST121, αίτιο SSTI.

Bouras et al (95)	2018	Οστεοαρθρίτιδα	Αθήνα	123	2007-2015	Ο κλώνος CA-MRSA ST80 είχε υψηλότερα ποσοστά γονιδίων επιθετικότητας, υψηλότερα ποσοστά εισαγωγής στη ΜΕΘ και μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας.
Doudoulakakis et al (14)	2019	SSSS	Αθήνα	31	2014-2017	Ανάδυση ενός ανθεκτικού στη μουπιροσίνη και στο φουσιδικό οξύ κλώνου MSSA, ST121 θετικού για γονίδια (*eta/etb*).

Συντομογραφίες: Mup: μουπιροσίνη, SSTI: Λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων, SSSS: σταφυλοκοκκικό αποφολιδωτικό σύνδρομο

Εικόνα 9. Αποτελέσματα τυποποίησης με MLST στελεχών MRSA και MSSA κατά το χρονικό διάστημα 2008-2014 (MRSA in children presenting to hospital in Crete. European Society for Paediatric Infectious Diseases Meeting.2015)



Στον πληθυσμό της περιοχής μας, το ποσοστό των MRSA ήταν 11.5% με πτωτικές τάσεις. Τα ευρήματά μας συνάδουν με προηγούμενες αναφορές πτωτικής πορείας των στελεχών MRSA της κοινότητας (244). Τα στελέχη MRSA χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερα επίπεδα αντοχής στην κλινδαμυκίνη και την τετρακυκλίνη σε σύγκριση με τα στελέχη MSSA και ήταν θετικά για τα γονίδια *lukS/lukF-PV* και *tst* ενώ σπάνια έφεραν γονίδια επιδερμολυσινών. Το γεγονός ότι η βαρύτητα νόσου δεν διέφερε μεταξύ στελεχών MRSA και MSSA σε ό,τι αφορά τη διάρκεια νοσηλείας, την ανάγκη για εντατική θεραπεία και τη θνητότητα, υποδηλώνει ότι πολλοί παράγοντες καθορίζουν την επιθετικότητα των στελεχών *S. aureus* εκτός από την αντιμικροβιακή αντοχή.

Στη μελέτη μας, η πλειοψηφία των λοιμώξεων ήταν λοιμώξεις κοινότητας ενώ οι νοσοκομειακές λοιμώξεις ήταν συχνότερες σε νοσηλευόμενους ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα και παρατεταμένη διάρκεια νοσηλείας, όπως παιδιά με κυστική ίνωση, κακοήθειες και νεογνά. Λίγες μελέτες παρέχουν συγκριτικά δεδομένα σχετικά με τις λοιμώξεις κοινότητας και τις νοσοκομειακές λοιμώξεις από *S. aureus* (239). Στη μελέτη μας, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των στελεχών CA, COHA και HA αναφορικά με την αντοχή στη μεθικιλλίνη, την ανάγκη εντατικής νοσηλείας και την φορία γονιδίων επιθετικότητας. Σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές, τα γονίδια PVL ανευρίσκονταν σε στελέχη CA-MRSA-ST80 ενώ ήταν σπάνια σε άλλα στελέχη (241,245).

Παρατηρήσαμε μια σημαντική, κατά 3 φορές αύξηση του αριθμού των SSSS μετά το έτος 2017, εύρημα συμβατό με δεδομένα που δείχνουν ανοδικές τάσεις των SSSS παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια (14,14). Είναι γνωστό ότι τα παιδιά είναι περισσότερο ευάλωτα σε λοιμώξεις *S. aureus* διαμεσολαβούμενες από τοξίνες. Αυτό αποδίδεται στην ανωριμότητα του ανοσοποιητικού τους συστήματος, την μειωμένη νεφρική κάθαρση των τοξινών και τη συχνή φορία *S. aureus* με δύο κορυφές στη νεαρή ηλικία και στην εφηβεία (246). Η επιδερμολυτική δράση των στελεχών *S. aureus* οφείλεται στη δράση των τοξινών A και B (14). Στην παρούσα μελέτη, τα στελέχη *S. aureus* που προκαλούσαν SSSS ήταν MSSA, συχνά ήταν ανθεκτικά στο φουσιδικό οξύ και στην πενικιλλίνη. Δεν έφεραν γονίδια *tst* και *lukS/lukF-PV* αλλά ήταν θετικά για *fnbA* και γονίδια επιδερμολυσινών. Τα στελέχη αυτά ανήκαν σε 8 PFGE τύπους και αντίστοιχα 8 κλώνους με MLST, ο ST121 ήταν ο πιο συχνός. Ο κλώνος ST121

περιγράφηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία το 2007 (247), και έχει περιγραφεί σε ποσοστό 10-30% των στελεχών στην Ευρώπη, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, στην Αφρική και στην Ασία (14,14,248,249). Στην Ελλάδα, η ανάδυση ενός MSSA κλώνου κοινότητας, ST121 ανθεκτικού στη μουπιροσίνη, στο φουσιδικό οξύ και θετικού για τουλάχιστον ένα *eta/etb γονίδιο* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2017 (14,14). Στη μελέτη μας, ο κλώνος ST121 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό άνω του 32% των στελεχών MSSA και ήταν PVL- αρνητικός και θετικός για γονίδια προσκόλλησης *fnbA* και γονίδια δερμολυσινών *eta* and *etb*. Ο κλώνος MSSA-ST121 είναι πιο επιθετικός από τον MRSA και σχετίζεται με αντοχή σε συνήθη αντιμικροβιακά όπως το φουσιδικό οεπιξύ, η τομπραμυκίνη και η μουπιροσίνη. Τα ευρήματά μας συνάδουν με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν χαμηλά ποσοστά PVL γονιδίων σε στελέχη ST121 και αναγνωρίζουν τον κλώνο PVL-αρνητικό, ST121 ως την κύρια αιτία νοσηρότητας (14,14,248).

Η κυριαρχία των στελεχών MSSA είναι σύνθετη και καθορίζεται από χαρακτηριστικά του ξενιστή, από το προφίλ των λοιμογόνων γονιδίων, την αντιμικροβιακή αντοχή και την ικανότητα των στελεχών να επιβιώνουν στο μικροπεριβάλλον. Η κυριαρχία των στελεχών MSSA είναι σύνθετη και καθορίζεται από χαρακτηριστικά του ξενιστή, από το προφίλ των λοιμογόνων γονιδίων, την αντιμικροβιακή αντοχή και την ικανότητα των στελεχών να επιβιώνουν στο μικροπεριβάλλον. Δεδομένα από προηγούμενη μελέτη του 2015 σε ενήλικες στην περιοχή μας, έδειξε επικράτηση των MRSA στελεχών με συχνότερους κλώνους τους ST80 και ST225 (250). Η διαφορά με την παρούσα μελέτη πιθανά οφείλεται στις διαφορές ξενιστή που υπάρχουν ανάμεσα σε ενήλικες και παιδιά. Τα παιδιά χαρακτηρίζονται από ανώριμες ανοσολογικές αποκρίσεις και είναι πολύ ευάλωτα στις ιογενείς λοιμώξεις. Ταυτόχρονα, τα παιδιά χαρακτηρίζονται από διαλείπουσα φορία *S. aureus* σε αντίθεση με τους ενήλικες που χαρακτηρίζονται από εμμένουσα φορία.

Στη μελέτη μας, όλα τα στελέχη MRSA ήταν ευαίσθητα στη μουπιροσίνη, ενώ τα MSSA στελέχη παρουσίασαν αυξανόμενη αντοχή στη μουπιροσίνη, ένα αντιβιοτικό πρώτης γραμμής με ευρεία χρήση σε λοιμώξεις δέρματος και μαλακών μορίων. Επιπλέον, ο MSSA, ST121 κλώνος χαρακτηρίζεται από στατιστικά σημαντικά, υψηλότερα ποσοστά αντοχής στο φουσιδικό οξύ, στη μουπιροσίνη και στην τομπραμυκίνη. Υποθέτουμε ότι η ευρεία χρήση της

μουπιροσίνης ως θεραπεία πρώτης γραμμής για την αποαποικιοποίηση στον πληθυσμό μας και η πολλές φορές άνευ διάκρισης χρήση του φουσιδικού οξέος και της τομπραμύκινης έχουν πιθανά προσφέρει ένα εξελικτικό πλεονέκτημα επιβίωσης σε κάποια στελέχη της κοινότητας.

Πλεονεκτήματα της παρούσας διατριβής αποτελούν ο προοπτικός σχεδιασμός της, η ανάλυση στελεχών *S. aureus* από νοσηλευόμενα παιδιά σε μεγάλο βάθος χρόνου. Περιορισμοί της μελέτης μας αποτελεί το γεγονός ότι περιλαμβάνει στελέχη από ένα κέντρο που ωστόσο αποτελεί κέντρο αναφοράς και το μόνο κέντρο που παρέχει τριτοβάθμιες υπηρεσίες στην περιοχή. Επίσης η μελέτη μόνο νοσηλευόμενων παιδιών ίσως αποτελεί επιπλέον περιοριστικό παράγοντα λόγω υψηλότερης βαρύτητας νόσου.

Συμπερασματικά, δείξαμε ότι ο CA-MSSA έχει αναδειχθεί το κύριο αίτιο λοιμώξεων δέρματος και μαλακών μορίων καθώς και σταφυλοκοκκικού αποφολιδωτικού συνδρόμου στα παιδιά και στους εφήβους. Ο κλώνος ST121 ήταν ο κυρίαρχος ανάμεσα στα στελέχη SSSS, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα αντοχής στο φουσιδικό οξύ και στη μουπιροσίνη. Η γνώση των φαινοτυπικών, των μοριακών χαρακτηριστικών καθώς και της επιδημιολογίας των στελεχών *S. aureus* μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες στην κλινική πρακτική ενώ ο χαρακτηρισμός του γενετικού τους υποβάθρου μπορεί να ερμηνεύσει τις τρέχουσες αλλαγές που παρατηρούνται στην επιδημιολογία και στις κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από *S. aureus.*

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Φαίνεται ότι η μοριακή επιδημιολογία του *S. aureus* αλλάζει σε βάθος χρόνου και νέα στελέχη αποκτούν εξελικτικό πλεονέκτημα στις ισορροπίες του μικροπεριβάλλοντος. Θα ήταν χρήσιμο στην κλινική πράξη, να υπάρχει συνεχής παρακολούθηση και καταγραφή των τάσεων των στελεχών MSSA, MRSA και των επικρατούντων κλώνων με μελλοντικές, καλά σχεδιασμένες πολυκεντρικές μελέτες. Προκείμενου να διαλευκανθούν τα αίτια των αλλαγών που παρατηρούνται στην επιδημιολογία της νόσου από *S. aureus*, πέρα από τις συνήθεις μικροβιολογικές πρακτικές απομόνωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα θα ήταν ενδιαφέρον στο μέλλον να δούμε μελέτες φορίας με χρήση της τεχνολογίας sequencing και μοριακών τεχνικών που βασίζονται στη μεταγενετική οι οποίες προσφέρουν πολλές χρήσιμες πληροφορίες για τις δυναμικές ισορροπίες του μικροπεριβάλλοντος και τις επιδράσεις τους στον ξενιστή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

ESPID Small Grant 2017

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Tsirigotaki M, Giormezis N, Maraki S, Spiliopoulou I and Galanakis E. Predominance of community- associated, methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* infections among hospitalized children and adolescents. J Med Microbiol. 2022 Mar;71(3). doi: 10.1099/jmm.0.001511.

Impact of vaccines on *Staphylococcus aureus* colonization: a systematic review and meta-analysis. Maria Tsirigotaki, Emmanouil Galanakis (under review)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

1. **MRSA in children presenting to hospital in Crete.** M.Tsirigotaki, E. Scoulica, C. Perdikogianni, F. Ladomenou, V. Bimpi, S. Maraki, E.Galanakis**.** Department of Paediatrics, University of Crete, 33rd Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), Leipzig,2015
2. **Clonal profile and resistance of *Staphylococcus aureus* isolates in children in Crete.**F.Ladomenou, M.Tsirigotaki, E.Scoulica, V.Bimpi,C.Perdikogianni, S.Maraki, E. Galanakis. 34th Annual Meetingofthe European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), Brighton, 2016
3. **Resistance of *Staphylococcus aureus* to first line antibiotics in children with community-associated infections in Crete.** M.Tsirigotaki, S.Maraki, E.Galanakis.35th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), Madrid, Spain,2017
4. **Invasive Staphylococcus aureus infections in children in Crete.** M.Tsirigotaki, F.Ladomenou, A.Zamboulaki, S.Maraki, E.Galanakis. 36th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), Malmo, Sweden, 2018
5. **Effects of childhood immunization on *S. aureus* infection and carriage: a systematic review and metanalysis.** M.Tsirigotaki, E.Galanakis. 37th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), Ljubljana, Slovenia, 2019
6. **Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus infections in children in Crete: A changing landscape.** M. Tsirigotaki, N. Giormezis, S. Maraki, I. Spiliopoulou, E. Galanakis· 38th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Virtual Meeting, 2020
7. **Etiology and antimicrobial susceptibility patterns of Hospital-Acquired Conjunctivitis in a Neonatal Intensive Care Unit in Crete, Southern Greece.** I. Goniotakis, M. Tsirigotaki, E.Vergadi, E. Galanakis, E. Hatzidaki. 38th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Virtual Meeting, 2020
8. **Increasing incidence of Staphylococcal Scalded Skin syndrome.** Glykeria Rouva, Elena Vergadi, Fani Ladomenou, Despoina Apostolaki, Panagiota Spyromitrou-
Xioufi, Maria Tsirigotaki, Nikolaos Giormezis, Sofia Maraki, Emmanouil

Galanakis. 39th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Virtual Meeting, 2021

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. Lancet Lond Engl. 2 Σεπτέμβριος 2006;368(9538):874–85.
2. Sivaraman K, Venkataraman N, Cole AM. Staphylococcus aureus nasal carriage and its contributing factors. Future Microbiol. Οκτώβριος 2009;4(8):999–1008.
3. Mehraj J, Witte W, Akmatov MK, Layer F, Werner G, Krause G. Epidemiology of Staphylococcus aureus Nasal Carriage Patterns in the Community. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;398:55–87.
4. Otto M. MRSA virulence and spread. Cell Microbiol. Οκτώβριος 2012;14(10):1513–21.
5. Petti CA, Fowler VG. Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis. Infect Dis Clin North Am. Ιούνιος 2002;16(2):413–35, x–xi.
6. Holmes NE, Howden BP. The rise of antimicrobial resistance: a clear and present danger. Expert Rev Anti Infect Ther. Ιούνιος 2011;9(6):645–8.
7. Sohail MR, Martin KR, Wilson WR, Baddour LM, Harmsen WS, Steckelberg JM. Medical Versus Surgical Management of Staphylococcus aureus Prosthetic Valve Endocarditis. Am J Med. Φεβρουάριος 2006;119(2):147–54.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology, 7th Edition. Elsevier Health Sciences. 2012. Elsevier Health Sciences. 2012.
9. Foster TJ. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. Vet Dermatol. Οκτώβριος 2009;20(5–6):456–70.
10. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. Eur Cell Mater. 31 Δεκέμβριος 2002;4:39–60.
11. Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of Staphylococcus aureus. Adv Microb Physiol. 2006;51:187–224.
12. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, Milatovic D. In Vitro Activity of Daptomycin against Gram-Positive European Clinical Isolates with Defined Resistance Determinants. Antimicrob Agents Chemother. Μάρτιος 2004;48(3):1007–11.
13. Otto M. Staphylococcus aureus toxins. Curr Opin Microbiol. Φεβρουάριος 2014;17:32–7.
14. Doudoulakakis A, Spiliopoulou I, Spyridis N, Giormezis N, Kopsidas J, Militsopoulou M, κ.ά. Emergence of a Staphylococcus aureus Clone Resistant to Mupirocin and Fusidic Acid Carrying Exotoxin Genes and Causing Mainly Skin Infections. J Clin Microbiol. Αύγουστος 2017;55(8):2529–37.
15. Inoshima I, Inoshima N, Wilke GA, Powers ME, Frank KM, Wang Y, κ.ά. A Staphylococcus aureus pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. Nat Med. 18 Σεπτέμβριος 2011;17(10):1310–4.
16. Wilke GA, Bubeck Wardenburg J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in Staphylococcus aureus alpha-hemolysin-mediated cellular injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 27 Ιούλιος 2010;107(30):13473–8.
17. Medical Microbiology. 4th edition.
18. Chua KYL, Seemann T, Harrison PF, Monagle S, Korman TM, Johnson PDR, κ.ά. The Dominant Australian Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clone ST93-IV [2B] Is Highly Virulent and Genetically Distinct. Horsburgh MJ, επιμελητής. PLoS ONE. 3 Οκτώβριος 2011;6(10):e25887.
19. Soong G, Chun J, Parker D, Prince A. Staphylococcus aureus Activation of Caspase 1/Calpain Signaling Mediates Invasion Through Human Keratinocytes. J Infect Dis. 15 Μάιος 2012;205(10):1571–9.
20. Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, κ.ά. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Proc Natl Acad Sci U S A. 7 Απρίλιος 2009;106(14):5883–8.

21. Chatterjee SS, Joo HS, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, κ.ά. Essential Staphylococcus aureus toxin export system. Nat Med. Μάρτιος 2013;19(3):364–7.
22. Surewaard BGJ, de Haas CJC, Vervoort F, Rigby KM, DeLeo FR, Otto M, κ.ά. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. Cell Microbiol. Αύγουστος 2013;15(8):1427–37.
23. Geiger T, Francois P, Liebeke M, Fraunholz M, Goerke C, Krismer B, κ.ά. The stringent response of Staphylococcus aureus and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression. PLoS Pathog. 2012;8(11):e1003016.
24. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host Defense and Pathogenesis in Staphylococcus aureus Infections. Infect Dis Clin North Am. Μάρτιος 2009;23(1):17–34.
25. Qi R, Joo HS, Sharma-Kuinkel B, Berlon NR, Park L, Fu C lung, κ.ά. Increased in vitro phenol-soluble modulin production is associated with soft tissue infection source in clinical isolates of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus. J Infect. Μάρτιος 2016;72(3):302–8.
26. Cribier B, Prévost G, Couppie P, Finck-Barbançon V, Grosshans E, Piémont Y. Staphylococcus aureus leukocidin: a new virulence factor in cutaneous infections? An epidemiological and experimental study. Dermatol Basel Switz. 1992;185(3):175–80.
27. Prevost G, Couppie P, Prevost P, Gayet S, Petiau P, Cribier B, κ.ά. Epidemiological data on Staphylococcus aureus strains producing synergohymenotropic toxins. J Med Microbiol. 1 Απρίλιος 1995;42(4):237–45.
28. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, κ.ά. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin--Producing Staphylococcus aureus in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clin Infect Dis. 1 Νοέμβριος 1999;29(5):1128–32.
29. Hamilton SM, Bryant AE, Carroll KC, Lockary V, Ma Y, McIndoo E, κ.ά. In Vitro Production of Panton-Valentine Leukocidin among Strains of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Causing Diverse Infections. Clin Infect Dis. 15 Δεκέμβριος 2007;45(12):1550–8.
30. Voyich JM, Otto M, Mathema B, Braughton KR, Whitney AR, Welty D, κ.ά. Is Panton-Valentine Leukocidin the Major Virulence Determinant in Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease? J Infect Dis. 15 Δεκέμβριος 2006;194(12):1761–70.
31. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. Toxins. Μάιος 2010;2(5):1148–65.
32. Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, κ.ά. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. PLoS Pathog. Οκτώβριος 2011;7(10):e1002271.
33. Rooijakkers SHM, van Wamel WJB, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp J a. G. Anti-opsonic properties of staphylokinase. Microbes Infect. Μάρτιος 2005;7(3):476–84.
34. Jongerius I, Köhl J, Pandey MK, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG, κ.ά. Staphylococcal complement evasion by various convertase-blocking molecules. J Exp Med. 1 Οκτώβριος 2007;204(10):2461–71.
35. Cheng AG, McAdow M, Kim HK, Bae T, Missiakas DM, Schneewind O. Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity. PLoS Pathog. 5 Αύγουστος 2010;6(8):e1001036.
36. Vanassche T, Peetermans M, Van Aelst LNL, Peetermans WE, Verhaegen J, Missiakas DM, κ.ά. The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related Staphylococcus aureus infections. J Infect Dis. Ιούλιος 2013;208(1):92–100.
37. Spaan AN, Surewaard BGJ, Nijland R, van Strijp JAG. Neutrophils versus Staphylococcus aureus: a biological tug of war. Annu Rev Microbiol. 2013;67:629–50.

38. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. Annu Rev Immunol. 23 Απρίλιος 2012;30(1):459–89.
39. Peacock SJ, Justice A, Griffiths D, de Silva GDI, Kantzanou MN, Crook D, κ.ά. Determinants of acquisition and carriage of Staphylococcus aureus in infancy. J Clin Microbiol. Δεκέμβριος 2003;41(12):5718–25.
40. Reddy EA, Shaw AV, Crump JA. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. Ιούνιος 2010;10(6):417–32.
41. Chien YW, Vidal JE, Grijalva CG, Bozio C, Edwards KM, Williams JV, κ.ά. Density interactions among Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Staphylococcus aureus in the nasopharynx of young Peruvian children. Pediatr Infect Dis J. Ιανουάριος 2013;32(1):72–7.
42. Williams RE. Healthy carriage of Staphylococcus aureus: its prevalence and importance. Bacteriol Rev. Μάρτιος 1963;27:56–71.
43. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. Ιούλιος 1997;10(3):505–20.
44. Quintero B, Araque M, van der Gaast-de Jongh C, Escalona F, Correa M, Morillo-Puente S, κ.ά. Epidemiology of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus colonization in healthy Venezuelan children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. Ιανουάριος 2011;30(1):7–19.
45. Mainous AG, Hueston WJ, Everett CJ, Diaz VA. Nasal carriage of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S aureus in the United States, 2001-2002. Ann Fam Med. Απρίλιος 2006;4(2):132–7.
46. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, κ.ά. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect Dis. Δεκέμβριος 2005;5(12):751–62.
47. Sollid JUE, Furberg AS, Hanssen AM, Johannessen M. Staphylococcus aureus: determinants of human carriage. Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis. Ιανουάριος 2014;21:531–41.
48. Smith-Vaughan H, Byun R, Nadkarni M, Jacques NA, Hunter N, Halpin S, κ.ά. Measuring nasal bacterial load and its association with otitis media. BMC Ear Nose Throat Disord. 10 Δεκέμβριος 2006;6:10.
49. Laupland KB, Lyytikäinen O, Sgaard M, Kennedy KJ, Knudsen JD, Ostergaard C, κ.ά. The changing epidemiology of Staphylococcus aureus bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. Clin Microbiol Infect. Μάιος 2013;19(5):465–71.
50. Frimodt-Møller N, Espersen F, Skinhøj P, Rosdahl VT. Epidemiology of Staphylococcus aureus bacteremia in Denmark from 1957 to 1990. Clin Microbiol Infect. Ιούνιος 1997;3(3):297–305.
51. Allard C, Carignan A, Bergevin M, Boulais I, Tremblay V, Robichaud P, κ.ά. Secular changes in incidence and mortality associated with Staphylococcus aureus bacteraemia in Quebec, Canada, 1991–2005. Clin Microbiol Infect. Μάιος 2008;14(5):421–8.
52. Wyllie DH, Peto TEA, Crook D. MRSA bacteraemia in patients on arrival in hospital: a cohort study in Oxfordshire 1997-2003. BMJ. 29 Οκτώβριος 2005;331(7523):992.
53. Laupland KB, Ross T, Gregson DB. *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections: Risk Factors, Outcomes, and the Influence of Methicillin Resistance in Calgary, Canada, 2000–2006. J Infect Dis. Αύγουστος 2008;198(3):336–43.
54. Johnson AP, Davies J, Guy R, Abernethy J, Sheridan E, Pearson A, κ.ά. Mandatory surveillance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) bacteraemia in England: the first 10 years. J Antimicrob Chemother. Απρίλιος 2012;67(4):802–9.
55. Sy RW, Kritharides L. Health care exposure and age in infective endocarditis: results of a contemporary population-based profile of 1536 patients in Australia. Eur Heart J. 1 Αύγουστος 2010;31(15):1890–7.

56. Fernández Guerrero ML, González López JJ, Goyenechea A, Fraile J, de Górgolas M. Endocarditis Caused by Staphylococcus aureus: A Reappraisal of the Epidemiologic, Clinical, and Pathologic Manifestations With Analysis of Factors Determining Outcome. Medicine (Baltimore). Ιανουάριος 2009;88(1):1–22.
57. Tleyjeh IM, Abdel-Latif A, Rahbi H, Scott CG, Bailey KR, Steckelberg JM, κ.ά. A Systematic Review of Population-Based Studies of Infective Endocarditis. Chest. Σεπτέμβριος 2007;132(3):1025–35.
58. Federspiel JJ. Increasing US Rates of Endocarditis With Staphylococcus aureus: 1999-2008. Arch Intern Med. 27 Φεβρουάριος 2012;172(4):363.
59. Bor DH, Woolhandler S, Nardin R, Brusch J, Himmelstein DU. Infective Endocarditis in the U.S., 1998–2009: A Nationwide Study. Wertheim HFL, επιμελητής. PLoS ONE. 20 Μάρτιος 2013;8(3):e60033.
60. Duval X, Delahaye F, Alla F, Tattevin P, Obadia JF, Le Moing V, κ.ά. Temporal Trends in Infective Endocarditis in the Context of Prophylaxis Guideline Modifications. J Am Coll Cardiol. Μάιος 2012;59(22):1968–76.
61. Benito N. Health Care–Associated Native Valve Endocarditis: Importance of Non-nosocomial Acquisition. Ann Intern Med. 5 Μάιος 2009;150(9):586.
62. Nadji G. Comparison of clinical and morphological characteristics of Staphylococcus aureus endocarditis with endocarditis caused by other pathogens. Heart. 1 Ιούλιος 2005;91(7):932–7.
63. Fournier PE, Casalta JP, Habib G, Messana T, Raoult D. Modification of the diagnostic criteria proposed by the duke endocarditis service to permit improved diagnosis of q fever endocarditis. Am J Med. Ιούνιος 1996;100(6):629–33.
64. Morel AS, Dubourg G, Prudent E, Edouard S, Gouriet F, Casalta JP, κ.ά. Complementarity between targeted real-time specific PCR and conventional broad-range 16S rDNA PCR in the syndrome-driven diagnosis of infectious diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Μάρτιος 2015;34(3):561–70.
65. Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. J Clin Microbiol. Νοέμβριος 1997;35(11):2733–9.
66. Ruotsalainen E, Sammalkorpi K, Laine J, Huotari K, Sarna S, Valtonen V, κ.ά. Clinical manifestations and outcome in Staphylococcus aureus endocarditis among injection drug users and nonaddicts: a prospective study of 74 patients. BMC Infect Dis. Δεκέμβριος 2006;6(1):137.
67. Murray RJ. Staphylococcus aureus infective endocarditis: diagnosis and management guidelines. Intern Med J. Δεκέμβριος 2005;35(s2):S25–44.
68. Chickering HT. STAPHYLOCOCCUS AUREUS PNEUMONIA. J Am Med Assoc. 1 Μάρτιος 1919;72(9):617.
69. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 15 Φεβρουάριος 2005;171(4):388–416.
70. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, Johannes RS. Epidemiology and Outcomes of Health-care–Associated Pneumonia. Chest. Δεκέμβριος 2005;128(6):3854–62.
71. Dufour P, Gillet Y, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Floret D, κ.ά. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in France: Emergence of a Single Clone That Produces Panton-Valentine Leukocidin. Clin Infect Dis. Οκτώβριος 2002;35(7):819–24.
72. Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, κ.ά. Severe Community-Onset Pneumonia in Healthy Adults Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carrying the Panton-Valentine Leukocidin Genes. Clin Infect Dis. 1 Ιανουάριος 2005;40(1):100–7.
73. Kallen AJ, Reed C, Patton M, Arnold KE, Finelli L, Hageman J. *Staphylococcus aureus* community-onset pneumonia in patients admitted to children's hospitals during autumn and winter of 2006–2007. Epidemiol Infect. Μάιος 2010;138(5):666–72.
74. Gonzalez BE, Hulten KG, Dishop MK, Lamberth LB, Hammerman WA, Mason EO, κ.ά. Pulmonary Manifestations in Children with Invasive Community-

Acquired Staphylococcus aureus Infection. Clin Infect Dis. 1 Σεπτέμβριος 2005;41(5):583–90.
75. Tong SYC, McDonald MI, Holt DC, Currie BJ. Global Implications of the Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Indigenous Populations. Clin Infect Dis. 15 Ιούνιος 2008;46(12):1871–8.
76. Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, Koogler TK, Arangelovich V, Humilier M, κ.ά. *Staphylococcus aureus* Sepsis and the Waterhouse–Friderichsen Syndrome in Children. N Engl J Med. 22 Σεπτέμβριος 2005;353(12):1245–51.
77. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, κ.ά. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. Science. 23 Φεβρουάριος 2007;315(5815):1130–3.
78. Diep BA, Chan L, Tattevin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, κ.ά. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. Proc Natl Acad Sci. 23 Μάρτιος 2010;107(12):5587–92.
79. Bubeck Wardenburg J, Bae T, Otto M, DeLeo FR, Schneewind O. Poring over pores: α-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in Staphylococcus aureus pneumonia. Nat Med. Δεκέμβριος 2007;13(12):1405–6.
80. Kebaier C, Chamberland RR, Allen IC, Gao X, Broglie PM, Hall JD, κ.ά. Staphylococcus aureus α-Hemolysin Mediates Virulence in a Murine Model of Severe Pneumonia Through Activation of the NLRP3 Inflammasome. J Infect Dis. 1 Μάρτιος 2012;205(5):807–17.
81. Parimon T, Li Z, Bolz DD, McIndoo ER, Bayer CR, Stevens DL, κ.ά. Staphylococcus aureus α-Hemolysin Promotes Platelet-Neutrophil Aggregate Formation. J Infect Dis. 1 Σεπτέμβριος 2013;208(5):761–70.
82. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus. The Lancet. Μάιος 2010;375(9725):1557–68.
83. Hua L, Hilliard JJ, Shi Y, Tkaczyk C, Cheng LI, Yu X, κ.ά. Assessment of an Anti-Alpha-Toxin Monoclonal Antibody for Prevention and Treatment of Staphylococcus aureus-Induced Pneumonia. Antimicrob Agents Chemother. Φεβρουάριος 2014;58(2):1108–17.
84. Smith C. Community acquired methicillin resistant staphylococcus aureus pneumonia. Στο: Radiopaedia.org [Διαδίκτυο]. Radiopaedia.org; 2017 [παρατίθεται 22 Νοέμβριος 2022]. Διαθέσιμο στο: http://radiopaedia.org/cases/community-acquired-methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-pneumonia
85. Krogsgaard MR, Wagn P, Bengtsson J. Epidemiology of acute vertebral osteomyelitis in Denmark: 137 cases in Denmark 1978–1982, compared to cases reported to the National Patient Register 1991–1993. Acta Orthop Scand. Ιανουάριος 1998;69(5):513–7.
86. Corrah TW, Enoch DA, Aliyu SH, Lever AM. Bacteraemia and subsequent vertebral osteomyelitis: a retrospective review of 125 patients. QJM. 1 Μάρτιος 2011;104(3):201–7.
87. Marie Beronius, Bo Bergman, Rune An. Vertebral Osteomyelitis in Go¨teborg, Sweden: A Retrospective Study of Patients During 1990?95. Scand J Infect Dis. Ιανουάριος 2001;33(7):527–32.
88. Torda AJ, Gottlieb T, Bradbury R. Pyogenic Vertebral Osteomyelitis: Analysis of 20 Cases and Review. Clin Infect Dis. 1 Φεβρουάριος 1995;20(2):320–8.
89. Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN. Osteomyelitis: A Review of Clinical Features, Therapeutic Considerations and Unusual Aspects. N Engl J Med. 22 Ιανουάριος 1970;282(4):198–206.
90. Espersen F, Frimodt-Møller N, Thamdrup Rosdahl V, Skinhøj P, Bentzon MW. Changing pattern of bone and joint infections due to Staphylococcus aureus: study of cases of bacteremia in Denmark, 1959-1988. Rev Infect Dis. Ιούνιος 1991;13(3):347–58.
91. Kehrer M, Pedersen C, Jensen TG, Lassen AT. Increasing incidence of pyogenic spondylodiscitis: A 14-year population-based study. J Infect. Απρίλιος 2014;68(4):313–20.

92. Kremers HM, Nwojo ME, Ransom JE, Wood-Wentz CM, Melton LJ, Huddleston PM. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969 to 2009. J Bone Joint Surg Am. 20 Δεκέμβριος 2015;97(10):837–45.
93. Hatzenbuehler J, Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis. Am Fam Physician. 1 Νοέμβριος 2011;84(9):1027–33.
94. Pimentel de Araujo F, Monaco M, Del Grosso M, Pirolo M, Visca P, Pantosti A. Staphylococcus aureus clones causing osteomyelitis: a literature review (2000–2020). J Glob Antimicrob Resist. Σεπτέμβριος 2021;26:29–36.
95. Bouras D, Doudoulakakis A, Tsolia M, Vaki I, Giormezis N, Petropoulou N, κ.ά. Staphylococcus aureus osteoarticular infections in children: an 8-year review of molecular microbiology, antibiotic resistance and clinical characteristics. J Med Microbiol. Δεκέμβριος 2018;67(12):1753–60.
96. Kechrid A, Pérez-Vázquez M, Smaoui H, Hariga D, Rodríguez-Baños M, Vindel A, κ.ά. Molecular analysis of community-acquired methicillin-susceptible and resistant Staphylococcus aureus isolates recovered from bacteraemic and osteomyelitis infections in children from Tunisia. Clin Microbiol Infect. Ιούλιος 2011;17(7):1020–6.
97. Gaviria-Agudelo C, Aroh C, Tareen N, Wakeland EK, Kim M, Copley LA. Genomic Heterogeneity of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Associated with Variation in Severity of Illness among Children with Acute Hematogenous Osteomyelitis. Becker K, επιμελητής. PLOS ONE. 18 Ιούνιος 2015;10(6):e0130415.
98. Gobao VC, Alfishawy M, Smith C, Byers KE, Yassin M, Urish KL, κ.ά. Risk Factors, Screening, and Treatment Challenges in *Staphylococcus aureus* Native Septic Arthritis. Open Forum Infect Dis. 1 Ιανουάριος 2021;8(1):ofaa593.
99. Kaandorp CJE, Krijnen P, Moens HJB, Habbema JDF, van Schaardenburg D. The outcome of bacterial arthritis. A prospective community-based study. Arthritis Rheum. Μάιος 1997;40(5):884–92.
100. Flammier S, Rasigade JP, Badiou C, Henry T, Vandenesch F, Laurent F, κ.ά. Human Monocyte-Derived Osteoclasts Are Targeted by Staphylococcal Pore-Forming Toxins and Superantigens. Heymann D, επιμελητής. PLOS ONE. 2 Μάρτιος 2016;11(3):e0150693.
101. Trouillet-Assant S, Lelièvre L, Martins-Simões P, Gonzaga L, Tasse J, Valour F, κ.ά. Adaptive processes of *Staphylococcus aureus* isolates during the progression from acute to chronic bone and joint infections in patients: S. aureus adaptation during BJI. Cell Microbiol. Οκτώβριος 2016;18(10):1405–14.
102. Badiou C, Dumitrescu O, George N, Forbes ARN, Drougka E, Chan KS, κ.ά. Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin in Clinical Specimens by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Tests. J Clin Microbiol. Απρίλιος 2010;48(4):1384–90.
103. Jin T, Zhu Y liang, Li J, Shi J, He X qing, Ding J, κ.ά. Staphylococcal Protein A, Panton-Valentine Leukocidin and Coagulase Aggravate the Bone Loss and Bone Destruction in Osteomyelitis. Cell Physiol Biochem. 2013;32(2):322–33.
104. Loughran AJ, Gaddy D, Beenken KE, Meeker DG, Morello R, Zhao H, κ.ά. Impact of *sarA* and Phenol-Soluble Modulins on the Pathogenesis of Osteomyelitis in Diverse Clinical Isolates of Staphylococcus aureus. Camilli A, επιμελητής. Infect Immun. Σεπτέμβριος 2016;84(9):2586–94.
105. Rasigade JP, Trouillet-Assant S, Ferry T, Diep BA, Sapin A, Lhoste Y, κ.ά. PSMs of Hypervirulent Staphylococcus aureus Act as Intracellular Toxins That Kill Infected Osteoblasts. Fitzgerald JR, επιμελητής. PLoS ONE. 14 Μάιος 2013;8(5):e63176.
106. Cassat JE, Hammer ND, Campbell JP, Benson MA, Perrien DS, Mrak LN, κ.ά. A Secreted Bacterial Protease Tailors the Staphylococcus aureus Virulence Repertoire to Modulate Bone Remodeling during Osteomyelitis. Cell Host Microbe. Ιούνιος 2013;13(6):759–72.
107. Dzupova O, Rozsypal H, Prochazka B, Benes J. Acute bacterial meningitis in adults: Predictors of outcome. Scand J Infect Dis. Ιανουάριος 2009;41(5):348–54.

108. Schlesinger LS, Ross SC, Schaberg DR. Staphylococcus aureus Meningitis: A Broad-Based Epidemiologic Study. Medicine (Baltimore). Μάρτιος 1987;66(2):148–56.
109. Pintado V, Pazos R, Jiménez-Mejías ME, Rodríguez-Guardado A, Gil A, García-Lechuz JM, κ.ά. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Meningitis in Adults: A Multicenter Study of 86 Cases. Medicine (Baltimore). Ιανουάριος 2012;91(1):10–7.
110. Teh BW, Slavin MA. *Staphylococcus aureus* meningitis: barriers to treatment. Leuk Lymphoma. Αύγουστος 2012;53(8):1443–4.
111. Pintado V, Meseguer M, Fortún J, Cobo J, Navas E, Quereda C, κ.ά. Clinical Study of 44 Cases of Staphylococcus aureus Meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Δεκέμβριος 2002;21(12):864–8.
112. Aguilar J, Urday-Cornejo V, Donabedian S, Perri M, Tibbetts R, Zervos M. Staphylococcus aureus Meningitis: Case Series and Literature Review. Medicine (Baltimore). Μάρτιος 2010;89(2):117–25.
113. Lerche A, Rasmussen N, Wandall JH, Bohr VA. Staphylococcus aureus Meningitis: A Review of 28 Consecutive Community-Acquired Cases. Scand J Infect Dis. Ιανουάριος 1995;27(6):569–73.
114. Rodríguez Guardado A, Antonio Maradona Hidalgo J, Pérez González F, Antonio Cartón Sánchez J, Blanco A, Carlos Rial J, κ.ά. Estudio comparativo de la meningitis posquirúrgica por Staphylococcus aureus sensible y resistente a meticilina. Med Clínica. Ιανουάριος 2005;124(3):102–3.
115. Jensen AG. Staphylococcus aureus Meningitis: A Review of 104 Nationwide, Consecutive Cases. Arch Intern Med. 23 Αύγουστος 1993;153(16):1902.
116. Pedersen M, Benfield TL, Skinhoej P, Jensen AG. Haematogenous Staphylococcus aureus meningitis. A 10-year nationwide study of 96 consecutive cases. BMC Infect Dis. Δεκέμβριος 2006;6(1):49.
117. Crowley AL, Peterson GE, Benjamin DK, Rimmer SH, Todd C, Cabell CH, κ.ά. Venous thrombosis in patients with short- and long-term central venous catheter–associated Staphylococcus aureus bacteremia*: Crit Care Med. Φεβρουάριος 2008;36(2):385–90.
118. Gonzalez BE, Teruya J, Mahoney DH, Hulten KG, Edwards R, Lamberth LB, κ.ά. Venous Thrombosis Associated With Staphylococcal Osteomyelitis in Children. Pediatrics. 1 Μάιος 2006;117(5):1673–9.
119. Nourse C, Starr M, Munckhof W. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus causes severe disseminated infection and deep venous thrombosis in children: Literature review and recommendations for management. J Paediatr Child Health. Οκτώβριος 2007;43(10):656–61.
120. Barrett SP, Savage MA, Rebec MP, Guyot A, Andrews N, Shrimpton SB. Antibiotic sensitivity of bacteria associated with community-acquired urinary tract infection in Britain. J Antimicrob Chemother. Σεπτέμβριος 1999;44(3):359–65.
121. Demuth PJ. Staphylococcus aureus Bacteriuria. Arch Intern Med. 1 Ιανουάριος 1979;139(1):78.
122. Lee BK, Crossley K, Gerding DN. The association between staphylococcus aureus bacteremia and bacteriuria. Am J Med. Αύγουστος 1978;65(2):303–6.
123. Muder RR, Brennen C, Rihs JD, Wagener MM, Obman A, Obman A, κ.ά. Isolation of Staphylococcus aureus from the Urinary Tract: Association of Isolation with Symptomatic Urinary Tract Infection and Subsequent Staphylococcal Bacteremia. Clin Infect Dis. 1 Ιανουάριος 2006;42(1):46–50.
124. Coll PP. Clinical risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteriuria in a skilled-care nursing home. Arch Fam Med. 1 Απρίλιος 1994;3(4):357–60.
125. McDonald M, Dougall A, Holt D, Huygens F, Oppedisano F, Giffard PM, κ.ά. Use of a Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping System To Demonstrate the Unique Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Remote Aboriginal Communities. J Clin Microbiol. Οκτώβριος 2006;44(10):3720–7.
126. Bowen AC, Tong SYC, Andrews RM, O'Meara IM, McDonald MI, Chatfield MD, κ.ά. Short-course oral co-trimoxazole versus intramuscular benzathine

benzylpenicillin for impetigo in a highly endemic region: an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. The Lancet. Δεκέμβριος 2014;384(9960):2132–40.
127. Steer AC, Jenney AWJ, Kado J, Batzloff MR, La Vincente S, Waqatakirewa L, κ.ά. High Burden of Impetigo and Scabies in a Tropical Country. Franco-Paredes C, επιμελητής. PLoS Negl Trop Dis. 23 Ιούνιος 2009;3(6):e467.
128. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, κ.ά. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in Three Communities. N Engl J Med. 7 Απρίλιος 2005;352(14):1436–44.
129. Liu C, Graber CJ, Karr M, Diep BA, Basuino L, Schwartz BS, κ.ά. A Population-Based Study of the Incidence and Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in San Francisco, 2004–2005. Clin Infect Dis. Ιούνιος 2008;46(11):1637–46.
130. Purcell K, Fergie J. Epidemic of Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections: A 14-Year Study at Driscoll Children's Hospital. Arch Pediatr Adolesc Med. 1 Οκτώβριος 2005;159(10):980.
131. Otto M. Community-associated MRSA: What makes them special? Int J Med Microbiol. Αύγουστος 2013;303(6–7):324–30.
132. Pallin DJ, Egan DJ, Pelletier AJ, Espinola JA, Hooper DC, Camargo CA. Increased US Emergency Department Visits for Skin and Soft Tissue Infections, and Changes in Antibiotic Choices, During the Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Ann Emerg Med. Μάρτιος 2008;51(3):291–8.
133. Hersh AL. National Trends in Ambulatory Visits and Antibiotic Prescribing for Skin and Soft-Tissue Infections. Arch Intern Med. 28 Ιούλιος 2008;168(14):1585.
134. Edelsberg J, Taneja C, Zervos M, Haque N, Moore C, Reyes K, κ.ά. Trends in US Hospital Admissions for Skin and Soft Tissue Infections. Emerg Infect Dis. Σεπτέμβριος 2009;15(9):1516–8.
135. Frei CR, Makos BR, Daniels KR, Oramasionwu CU. Emergence of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin and soft tissue infections as a common cause of hospitalization in United States children. J Pediatr Surg. Οκτώβριος 2010;45(10):1967–74.
136. Hayward A, Knott F, Petersen I, Livermore DM, Duckworth G, Islam A, κ.ά. Increasing Hospitalizations and General Practice Prescriptions for Community-onset Staphylococcal Disease, England. Emerg Infect Dis. Μάιος 2008;14(5):720–6.
137. Saxena S, Thompson P, Birger R, Bottle A, Spyridis N, Wong I, κ.ά. Increasing Skin Infections and *Staphylococcus aureus* Complications in Children, England, 1997–2006. Emerg Infect Dis. Μάρτιος 2010;16(3):530–3.
138. Vaska VL, Nimmo GR, Jones M, Grimwood K, Paterson DL. Increases in Australian cutaneous abscess hospitalisations: 1999–2008. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Ιανουάριος 2012;31(1):93–6.
139. David MZ, Daum RS. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. Clin Microbiol Rev. Ιούλιος 2010;23(3):616–87.
140. Hasty MB, Klasner A, Kness S, Denmark TK, Ellis D, Herman MI, κ.ά. Cutaneous Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among All Skin and Soft-tissue Infections in Two Geographically Distant Pediatric Emergency Departments. Acad Emerg Med. Ιανουάριος 2007;14(1):35–40.
141. Talan DA, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, Limbago B, Albrecht V, κ.ά. Comparison of Staphylococcus aureus From Skin and Soft-Tissue Infections in US Emergency Department Patients, 2004 and 2008. Clin Infect Dis. 15 Ιούλιος 2011;53(2):144–9.
142. Frazee BW, Lynn J, Charlebois ED, Lambert L, Lowery D, Perdreau-Remington F. High Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Emergency Department Skin and Soft Tissue Infections. Ann Emerg Med. Μάρτιος 2005;45(3):311–20.
143. Jacobus CH, Lindsell CJ, Leach SD, Fermann GJ, Kressel AB, Rue LE. Prevalence and demographics of methicillin resistant Staphylococcus aureusin

culturable skin and soft tissue infections in an urban emergency department. BMC Emerg Med. Δεκέμβριος 2007;7(1):19.
144. Nimmo GR. USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. Αύγουστος 2012;18(8):725–34.
145. Kobayashi SD, Malachowa N, Whitney AR, Braughton KR, Gardner DJ, Long D, κ.ά. Comparative Analysis of USA300 Virulence Determinants in a Rabbit Model of Skin and Soft Tissue Infection. J Infect Dis. 15 Σεπτέμβριος 2011;204(6):937–41.
146. Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T. TOXIC-SHOCK SYNDROME ASSOCIATED WITH PHAGE-GROUP-I STAPHYLOCOCCI. The Lancet. Νοέμβριος 1978;312(8100):1116–8.
147. Issa NC, Thompson RL. Staphylococcal toxic shock syndrome: Suspicion and prevention are keys to control. Postgrad Med. Οκτώβριος 2001;110(4):55–62.
148. Herzer CM. Toxic shock syndrome: broadening the differential diagnosis. J Am Board Fam Pract. Απρίλιος 2001;14(2):131–6.
149. Osterholm MT, Forfang JC. Toxic-Shock Syndrome in Minnesota: Results of an Active-Passive Surveillance System. J Infect Dis. 1 Απρίλιος 1982;145(4):458–64.
150. DeVries AS, Lesher L, Schlievert PM, Rogers T, Villaume LG, Danila R, κ.ά. Staphylococcal Toxic Shock Syndrome 2000–2006: Epidemiology, Clinical Features, and Molecular Characteristics. Diep BA, επιμελητής. PLoS ONE. 10 Αύγουστος 2011;6(8):e22997.
151. Descloux E, Perpoint T, Ferry T, Lina G, Bes M, Vandenesch F, κ.ά. One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 28 Νοέμβριος 2007;27(1):37–43.
152. Musser JM, Schlievert PM, Chow AW, Ewan P, Kreiswirth BN, Rosdahl VT, κ.ά. A single clone of Staphylococcus aureus causes the majority of cases of toxic shock syndrome. Proc Natl Acad Sci. Ιανουάριος 1990;87(1):225–9.
153. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep. 2 Δεκέμβριος 1997;46(RR-10):1–55.
154. Patel GK, Finlay AY. Staphylococcal Scalded Skin Syndrome: Diagnosis and Management. Am J Clin Dermatol. 2003;4(3):165–75.
155. Handler MZ, Schwartz RA. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. J Eur Acad Dermatol Venereol. Νοέμβριος 2014;28(11):1418–23.
156. Lowney ED, Baublis JV, Kreye GM, Harrell ER, McKenzie AR. The scalded skin syndrome in small children. Arch Dermatol. Απρίλιος 1967;95(4):359–69.
157. Melish ME, Glasgow LA. The staphylococcal scalded-skin syndrome. N Engl J Med. 14 Δεκέμβριος 1970;282(20):1114–9.
158. Liy-Wong C, Pope E, Weinstein M, Lara-Corrales I. Staphylococcal scalded skin syndrome: An epidemiological and clinical review of 84 cases. Pediatr Dermatol. Ιανουάριος 2021;38(1):149–53.
159. El Helali N, Carbonne A, Naas T, Kerneis S, Fresco O, Giovangrandi Y, κ.ά. Nosocomial outbreak of staphylococcal scalded skin syndrome in neonates: epidemiological investigation and control. J Hosp Infect. Οκτώβριος 2005;61(2):130–8.
160. https://dermnetnz.org/images/staphylococcal-scalded-skin-syndrome-images.
161. ΕΘΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΤΟΧΗ ΕΚΘΕΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ 2015-2017. 2019;
162. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, Wilson DN. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. Biol Chem. 1 Μάιος 2014;395(5):559–75.
163. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. Ιούλιος 1997;40(1):135–6.

164. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in Staphylococcus aureus. Emerg Infect Dis. 2001;7(2):327–32.
165. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest. Δεκέμβριος 2003;111(9):1265–73.
166. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Novick RP, Venkataraman L, Wennersten C, κ.ά. Staphylococcus aureus accessory gene regulator (agr) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? J Infect Dis. 15 Μάρτιος 2003;187(6):929–38.
167. Tsuji BT, Rybak MJ, Lau KL, Sakoulas G. Evaluation of accessory gene regulator (agr) group and function in the proclivity towards vancomycin intermediate resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. Μάρτιος 2007;51(3):1089–91.
168. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. Trends Microbiol. Οκτώβριος 1996;4(10):401–7.
169. Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK, κ.ά. High-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with a polymicrobial biofilm. Antimicrob Agents Chemother. Ιανουάριος 2007;51(1):231–8.
170. Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, κ.ά. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of Staphylococcus aureus. Science. 28 Νοέμβριος 2003;302(5650):1569–71.
171. Liu C, Chambers HF. *Staphylococcus aureus* with Heterogeneous Resistance to Vancomycin: Epidemiology, Clinical Significance, and Critical Assessment of Diagnostic Methods. Antimicrob Agents Chemother. Οκτώβριος 2003;47(10):3040–5.
172. Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. Δεκέμβριος 1993;37(5):1086–94.
173. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, κ.ά. Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus. The Lancet. Ιούλιος 2001;358(9277):207–8.
174. Meka VG, Gold HS. Antimicrobial Resistance to Linezolid. Clin Infect Dis. Οκτώβριος 2004;39(7):1010–5.
175. Friedman L, Alder JD, Silverman JA. Genetic Changes That Correlate with Reduced Susceptibility to Daptomycin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. Ιούνιος 2006;50(6):2137–45.
176. Kaatz GW, Lundstrom TS, Seo SM. Mechanisms of daptomycin resistance in Staphylococcus aureus. Int J Antimicrob Agents. Οκτώβριος 2006;28(4):280–7.
177. Patel JB, Jevitt LA, Hageman J, McDonald LC, Tenover FC. An Association between Reduced Susceptibility to Daptomycin and Reduced Susceptibility to Vancomycin in Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis. 1 Ιούνιος 2006;42(11):1652–3.
178. Cui L, Tominaga E, Neoh H min, Hiramatsu K. Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. Μάρτιος 2006;50(3):1079–82.
179. O'Neill AJ, Cove JH, Chopra I. Mutation frequencies for resistance to fusidic acid and rifampicin in Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 1 Μάιος 2001;47(5):647–50.
180. Besier S, Ludwig A, Brade V, Wichelhaus TA. Molecular analysis of fusidic acid resistance in Staphylococcus aureus: Molecular analysis of fusidic acid resistance in S. aureus. Mol Microbiol. 10 Ιανουάριος 2003;47(2):463–9.
181. Udo EE. A chromosomal location of the mupA gene in Staphylococcus aureus expressing high-level mupirocin resistance. J Antimicrob Chemother. 1 Μάιος 2003;51(5):1283–6.
182. Lorian. Antibiotics in Laboratory Medicine. 2005.
183. Trzcinski K, Cooper BS, Hryniewicz W, Dowson CG. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother. 1 Ιούνιος 2000;45(6):763–70.

184. Guay GG, Khan SA, Rothstein DM. The tet(K) Gene of Plasmid pT181 of Staphylococcus aureus Encodes an Efflux Protein That Contains 14 Transmembrane Helices. Plasmid. Σεπτέμβριος 1993;30(2):163–6.
185. Yamaguchi A, Shiina Y, Fujihira E, Sawai T, Noguchi N, Sasatsu M. The tetracycline efflux protein encoded by the *tet* (K) gene from *Staphylococcus aureus* is a metal-tetracycline/H^+ antiporter. FEBS Lett. 29 Μάιος 1995;365(2–3):193–7.
186. Schmitz FJ. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European Staphylococcus aureus isolates. J Antimicrob Chemother. 1 Φεβρουάριος 2001;47(2):239–40.
187. Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. Clin Infect Dis. 15 Φεβρουάριος 2002;34(4):482–92.
188. Archer GL. *Staphylococcus aureus* : A Well–Armed Pathogen. Clin Infect Dis. Μάιος 1998;26(5):1179–81.
189. Baker ADL, Macnicol MF. Haematogenous osteomyelitis in children: epidemiology, classification, aetiology and treatment. Paediatr Child Health. Φεβρουάριος 2008;18(2):75–84.
190. Shorr AF, Tabak YP, Gupta V, Johannes R, Liu LZ, Kollef MH. Morbidity and cost burden of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in early onset ventilator-associated pneumonia. Crit Care. 2006;10(3):R97.
191. Lambert ML, Suetens C, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, κ.ά. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. Lancet Infect Dis. Ιανουάριος 2011;11(1):30–8.
192. McHugh CG, Riley LW. Risk Factors and Costs Associated With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. Infect Control Hosp Epidemiol. Μάιος 2004;25(5):425–30.
193. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The Impact of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Bacteremia on Patient Outcomes: Mortality, Length of Stay, and Hospital Charges. Infect Control Hosp Epidemiol. Φεβρουάριος 2005;26(2):166–74.
194. Chang VS, Dhaliwal DK, Raju L, Kowalski RP. Antibiotic Resistance in the Treatment of Staphylococcus aureus Keratitis: a 20-Year Review. Cornea. Ιούνιος 2015;34(6):698–703.
195. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. Ιανουάριος 2014;22(1):42–7.
196. A report from the NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control. Δεκέμβριος 2004;32(8):470–85.
197. Chambers H. The Changing Epidemiology of Staphylococcus aureus? Emerg Infect Dis. Απρίλιος 2001;7(2):178–82.
198. Moellering RC. Why Has Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Become Such a Successful Pathogen in Adults? Infect Dis Clin Pract. Σεπτέμβριος 2010;18(5):286–91.
199. Herold BC. Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Children With No Identified Predisposing Risk. JAMA. 25 Φεβρουάριος 1998;279(8):593.
200. Panton. Panton, P.N. and Valentine, F.C.O. (1932) Staphylococcal Toxin. The Lancet, 219, 506-508. 1932;
201. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. Regulation of exoprotein gene expression in Staphylococcus aureus by agr. Mol Gen Genet MGG. Ιανουάριος 1986;202(1):58–61.
202. Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Møller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant Staphylococcus aureus SCCmec types I–V. Clin Microbiol Infect. Ιούλιος 2007;13(7):725–7.
203. Levine DP. Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Endocarditis in the Detroit Medical Center. Ann Intern Med. 1 Σεπτέμβριος 1982;97(3):330.

204. [37] Gottlieb, T., Su, W.Y., Merlino, J., et al. (2008) Recognition of USA300 Isolates of Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Australia. The Medical Journal of Australia, 189, 179-180. 2008;
205. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300: origin and epidemiology. J Antimicrob Chemother. 1 Σεπτέμβριος 2009;64(3):441–6.
206. Larsen AR, Böcher S, Stegger M, Goering R, Pallesen LV, Skov R. Epidemiology of European Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 80 Type IV Strains Isolated in Denmark from 1993 to 2004. J Clin Microbiol. Ιανουάριος 2008;46(1):62–8.
207. Diep BA, Carleton HA, Chang RF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. Roles of 34 Virulence Genes in the Evolution of Hospital- and Community-Associated Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. Ιούνιος 2006;193(11):1495–503.
208. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Healthcare Quality Promotion (DHQP). 28 Φεβρουάριος 2019;
209. Kourtis AP, Hatfield K, Baggs J, et al. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Bloodstream Infections — United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2019;68:214–219. 2019;
210. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). 2020;
211. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. Μάρτιος 2007;13(3):222–35.
212. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, κ.ά. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. Σεπτέμβριος 1995;33(9):2233–9.
213. Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, de Lencastre H. Comparison of molecular typing methods for characterization of Staphylococcus epidermidis: proposal for clone definition. J Clin Microbiol. Ιανουάριος 2008;46(1):118–29.
214. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol. Ιούνιος 1999;37(6):1661–9.
215. van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, Cookson B, Forey F, Etienne J, κ.ά. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. J Clin Microbiol. Ιούνιος 1998;36(6):1653–9.
216. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. Μάρτιος 2000;38(3):1008–15.
217. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance stand_ards for antimicrobial susceptibility testing: 28th informational supplement.Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S28. 2018.
218. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. Απρίλιος 1990;262(4):56–61, 64–5.
219. Riedel KH, Wingfield BD, Britz TJ. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers. FEMS Microbiol Lett. 1 Απρίλιος 1992;71(1):69–72.
220. Harris S, Jones DB. Optimisation of the polymerase chain reaction. Br J Biomed Sci. Σεπτέμβριος 1997;54(3):166–73.
221. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus. J Bacteriol. Σεπτέμβριος 1976;127(3):1550–7.

222. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, κ.ά. Enzymatic Amplification of β-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science. 20 Δεκέμβριος 1985;230(4732):1350–4.
223. Rahim S, Pillai SK, Gold HS, Venkataraman L, Inglima K, Press RA. Linezolid-Resistant, Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Infection in Patients without Prior Exposure to Linezolid. Clin Infect Dis. 1 Ιούνιος 2003;36(11):e146–8.
224. Scheu PM, Berghof K, Stahl U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. Food Microbiol. Φεβρουάριος 1998;15(1):13–31.
225. Straub JA, Hertel C, Hammes WP. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of Staphylococcus aureus in meat starter cultures and dairy products. J Food Prot. Οκτώβριος 1999;62(10):1150–6.
226. hønning K, Westh H, Lisby G. Fast screening for MRSA by quadriplex real_time PCR. 2014, 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2014 May 10-13; Barcelona Spain, Poster Number: 1534.
227. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, κ.ά. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus harbouring either mecA or the new mecA homologue mecA(LGA251). Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. Απρίλιος 2012;18(4):395–400.
228. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, κ.ά. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. Infect Immun. Φεβρουάριος 2002;70(2):631–41.
229. Aires de Sousa M, Sanches IS, Ferro ML, Vaz MJ, Saraiva Z, Tendeiro T, κ.ά. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone. J Clin Microbiol. Σεπτέμβριος 1998;36(9):2590–6.
230. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database. J Clin Microbiol. Νοέμβριος 2003;41(11):5113–20.
231. Roberts RB, de Lencastre A, Eisner W, Severina EP, Shopsin B, Kreiswirth BN, κ.ά. Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in 12 New York hospitals. MRSA Collaborative Study Group. J Infect Dis. Ιούλιος 1998;178(1):164–71.
232. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, κ.ά. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. Φεβρουάριος 1994;32(2):407–15.
233. Deplano A, Schuermans A, Van Eldere J, Witte W, Meugnier H, Etienne J, κ.ά. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. J Clin Microbiol. Οκτώβριος 2000;38(10):3527–33.
234. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, κ.ά. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol. Απρίλιος 2003;41(4):1574–85.
235. Cookson BD, Aparicio P, Deplano A, Struelens M, Goering R, Marples R. Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Med Microbiol. Μάρτιος 1996;44(3):179–84.
236. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijl J m, Laurent F, κ.ά. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 24 Ιανουάριος 2013;18(4):20380.

237. Neoh H min, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. Infect Genet Evol. Οκτώβριος 2019;74:103935.
238. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. Δεκέμβριος 2003;47(12):3926–34.
239. Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, Doudoulakakis A, Jelastopulu E, Chini V, κ.ά. A 12-year survey of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Greece: ST80-IV epidemic? Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. Νοέμβριος 2014;20(11):O796-803.
240. Doudoulakakis AG, Bouras D, Drougka E, Kazantzi M, Michos A, Charisiadou A, κ.ά. Community-associated Staphylococcus aureus pneumonia among Greek children: epidemiology, molecular characteristics, treatment, and outcome. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. Ιούλιος 2016;35(7):1177–85.
241. Niniou I, Vourli S, Lebessi E, Foustoukou M, Vatopoulos A, Pasparakis DG, κ.ά. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired, methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in children in central Greece. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. Σεπτέμβριος 2008;27(9):831–7.
242. Katopodis GD, Grivea IN, Tsantsaridou AJ, Pournaras S, Petinaki E, Syrogiannopoulos GA. Fusidic acid and clindamycin resistance in community-associated, methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in children of Central Greece. BMC Infect Dis. 13 Δεκέμβριος 2010;10:351.
243. Kachrimanidou M, Tsorlini E, Katsifa E, Vlachou S, Kyriakidou S, Xanthopoulou K, κ.ά. Prevalence and molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a tertiary Greek hospital. Hippokratia. Ιανουάριος 2014;18(1):24–7.
244. Hultén KG, Mason EO, Lamberth LB, Forbes AR, Revell PA, Kaplan SL. Analysis of Invasive Community-Acquired Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus Infections During a Period of Declining Community Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infections at a Large Children’s Hospital. Pediatr Infect Dis J. Μάρτιος 2018;37(3):235–41.
245. Mairi A, Touati A, Lavigne JP. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ST80 Clone: A Systematic Review. Toxins. 14 Φεβρουάριος 2020;12(2):E119.
246. Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of Staphylococcus aureus. FEMS Immunol Med Microbiol. 28 Νοέμβριος 2003;39(2):181–9.
247. Schefold JC, Esposito F, Storm C, Heuck D, Krüger A, Jörres A, κ.ά. Therapy-refractory Panton Valentine Leukocidin-positive community-acquired methicillin-sensitive Staphylococcus aureus sepsis with progressive metastatic soft tissue infection: a case report. J Med Case Reports. Δεκέμβριος 2007;1(1):165.
248. Conceição T, Aires-de-Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, Coelho R, κ.ά. High prevalence of ST121 in community-associated methicillin-susceptible Staphylococcus aureus lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Φεβρουάριος 2011;30(2):293–7.
249. Azarian T, Cella E, Baines SL, Shumaker MJ, Samel C, Jubair M, κ.ά. Genomic Epidemiology and Global Population Structure of Exfoliative Toxin A-Producing Staphylococcus aureus Strains Associated With Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. Front Microbiol. 18 Αύγουστος 2021;12:663831.
250. Moschou A, Maraki S, Giormezis N, Moraitaki H, Stafylaki D, Militsopoulou M, κ.ά. Prevalence and molecular epidemiology of Staphylococcus aureus nasal colonization in four nursing home residents in Crete, Greece. J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother. Φεβρουάριος 2020;26(2):199–204.

JOURNAL OF
MEDICAL MICROBIOLOGY

RESEARCH ARTICLE
Tsirigotaki *et al.*, *Journal of Medical Microbiology*
DOI 10.1099/jmm.0.001511

MICROBIOLOGY SOCIETY

Predominance of community- associated, methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* infections among hospitalized children and adolescents

Maria Tsirigotaki[1], Nikolaos Giormezis[2], Sofia Maraki[3], Iris Spiliopoulou[2] and Emmanouil Galanakis[1,*]

Abstract

Introduction. *Staphylococcus aureus* infections cause significant morbidity and mortality in children and adolescents.

Gap statement. There is limited data on the characteristics of *S. aureus* infections requiring hospitalization in childhood.

Aim. To investigate the molecular epidemiology and antibiotic resistance of *S. aureus* clinical isolates from children and adolescents.

Methodology. All *S. aureus* isolates recovered from patients aged <18 years, admitted to a referral hospital, with culture- proven invasive or non-i nvasive infections during the 4 year period 2015 to 2018 were analysed for antimicrobial resistance, virulence genes, PFGE and multilocus sequence typing (MLST). Cases were assigned to community-associated, community-onset healthcare- associated or hospital- associated infections based on epidemiological case definitions.

Results. Among 139 *S. aureus* infections, 88.5 % (123/139) were caused by methicillin-susceptible isolates (MSSA) and 73.4 % (102/139) were classified as community-a ssociated infections. *tst* and *lukS/lukF- PV* genes were more common among MRSA as compared to MSSA isolates (*tst,* p 0.04; *lukS/lukF- PV,* p 0.007). Invasive disease was noted in 22/139 patients (15.8 %). Staphylococcal scalded skin syndrome caused by fusidic- resistant MSSA increased over time (22.8 % in 2017–2018 vs 8.3 % in 2015–2016, OR 3.24; 95 % CI 1.10–8.36; *P* 0.03). By PFGE genotyping, 22 pulsotypes were identified. A total of five sequence types (STs) were identified among 58 isolates analysed by MLST. More than one third of MSSA isolates (40/123, 32.5 %) and 13/23 (56.5 %) of SSSS isolates belonged to pulsotype 1, classified as sequence type 121 (ST121). MRSA isolates were equally distributed to pulsotypes A (ST30), B (ST239), C (ST80), H (ST225). ST121 isolates carried *fnbA* (40/40), *eta/etb* genes (29/40), exhibited high resistance to fusidic acid and were increasingly resistant to mupirocin.

Conclusion. In our population, community- associated MSSA was the predominant cause of *S. aureus* infections characterized by polyclonality, increasing resistance to fusidic acid and mupirocin. PFGE type 1 ST121 clone, harboured exfoliative toxin genes and was associated with rising trends of SSSS.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is a common pathogen in children and adolescents and a cause of a broad spectrum of infections ranging from mild skin and soft tissue to invasive infections, including bacteraemia, necrotizing pneumonia, endocarditis, musculoskeletal infections and toxin-m ediated disease [1]. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates were first described in the hospital setting and soon emerged in the community [2]. Recently, several studies have reported the predominance of methicillin- susceptible isolates (MSSA) [2–5].

Received 13 October 2021; Accepted 11 January 2022
Author affiliations: [1]Department of Paediatrics, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece; [2]National Reference Laboratory for Staphylococci, School of Medicine, University of Patras, Patras, Greece; [3]Department of Microbiology, Heraklion University Hospital, Crete, Greece. *Correspondence: Emmanouil Galanakis, emmgalan@ uoc. gr
Keywords: *Staphylococcus aureus*; MRSA; PVL; virulence; SSSS; ST121.
Abbreviations: CA, community- associated; COHA, community- onset healthcare-associated; HA, hospital- associated; INV, invasive disease; MLST, multilocus sequence typing; MRSA, methicillin- resistant *S.aureus*; MSSA, methicillin- susceptible *S.aureus*; PVL, Panton- Valentine leukocidin; SSTI, skin and soft tissue infections; ST, sequence type; TMD, toxin mediated disease.

001511 © 2022 The Authors

The capacity of *S. aureus to cause infection* is related to the expression of virulence factors and the production of a wide variety of toxins, which include pore- forming toxins, phagocytosis inhibitors and superantigens [6]. To date, four serotypes of exfoliative toxins have been identified of which exfoliative toxins A (ETA) and B (ETB) are responsible for most human cases of toxin- mediated disease [7]. Exfoliative-p rotein producing isolates have been associated with localized epidermal infections such as bullous impetigo and generalized disease [8, 9], whereas staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS) is the most common toxin- mediated disease mainly affecting young children [9]. Toxic shock syndrome toxin (TSST) is an important *S. aureus* superantigen, which acts by stimulating release of IL- 1, IL-2 , TNF-α and other cytokines [10]. Two identified fibronectin- binding proteins (FnBP A and B) encoded by the *fnbA* and *fnbB* genes are involved in adherence and internalization of S. aureus into the host cell [11, 12] and have both been associated with severe infections [13]. Panton–Valentine leukocidin (PVL), first described in 1932, is a toxin composed of two components, *LukS*- PV and *LukF*- PV, leading to neutrophil lysis [13, 14] and linked to community- onset MRSA disease worldwide [15].
While several studies have described the molecular characteristics and epidemiology of *S. aureus* isolates in asymptomatic individuals [16, 17], little is known about the characteristics of *S. aureus* infections requiring hospitalization in childhood. The aim of this prospective cohort study was to investigate the epidemiology and the molecular characteristics of *S. aureus* isolates in children and adolescents requiring in- hospital care.

METHODS

Design and population

This cohort study included all *S. aureus* isolates recovered from children and adolescents younger than 18 years who were admitted to the University Hospital of Heraklion, Crete from 1 January 2015 to 31 December 2018. The hospital provides primary and secondary healthcare services to a population of approximately 306 000 and tertiary services to the largest island in Greece covering a population of 623 000 and includes general paediatric (capacity 30 beds), neonatal intensive care (25 beds), paediatric intensive care (four beds), paediatric oncology (12 beds) and paediatric surgery (22 beds) services. Medical records were reviewed for demographic and clinical characteristics. Infections were classified into (I) skin and soft tissue infections (SSTIs) such as impetigo, cellulitis, abscess, omphalitis, (II) toxin- mediated disease (TMD) including staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome and (III) invasive disease (INV) including septicaemia, pneumonia, osteomyelitis and septic arthritis.

Definitions

Infections with positive cultures obtained from normally sterile fluids, including CSF, blood and synovial fluid were considered invasive infections. Isolates obtained from anatomic sites not indicative of infection were classified as colonization cultures and were excluded.

Infections and the recovered isolates were classified as community-a ssociated (CA), community- onset healthcare-associated (COHA) and hospital- associated (HA) based on

established CDC criteria [18]. To examine possible changes over time, we studied subsets of isolates collected during two periods: 2015–2016 (period A) and 2017–2018 (period B).

Microbiology

The isolates were identified by conventional methods, including colony morphology, Gram staining, standard biochemical tests and by the automated Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy l' Etoile, France). All *S. aureus* isolates were stored in brain heart infusion (BHI) broth with 20 % glycerol at −80 °C for further testing.

Antimicrobial susceptibilities were determined for penicillin, oxacillin, erythromycin, clindamycin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, linezolid, teicoplanin, vancomycin, tetracycline, tigecycline, fusidic acid, mupirocin, rifampicin, fosfomycin, nitrofurantoin and trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-S MX) using the Vitek 2 system (bioMérieux), and the results were interpreted according to the 2018 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria [19]. *S. aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 43300 were used as control strains. Isolates were phenotypically classified as methicillin- susceptible *S. aureus* (MSSA) or MRSA based on the cefoxitin disc diffusion test and the latex agglutination test for the detection of PBP2a (bioMerieux). Inducible resistance to clindamycin was tested by d-t est as per CLSI guidelines [19]. *S. aureus* isolates that were resistant to cefoxitin were phenotypically classified as MRSA and verified by PCR for *mecA* or *mecC* gene carriage [20, 21]. Genes encoding Panton–Valentine leukocidin (*lukS/lukF- PV*), toxic shock syndrome toxin- I (*tst*), exfoliative toxins (*eta, etb*), fibronectin binding proteins A and B (*fnbA*, *fnbB*) were investigated by polymerase chain reactions with specific primers, as previously described [22, 23].

Isolates were classified into main pulsotypes and subtypes by PFGE of chromosomal DNA *SmaI* digests performed in a CHEF DR III apparatus (Bio- Rad, Richmond, CA, USA). According to criteria established by Miragaia *et al*. [24], patterns differing by less than 79 % (corresponding to a difference of less than seven bands) were considered to belong to the same PFGE type [25]. A dendrogram comparing molecular weights of strains' DNA fragments was performed by FPQuest software version 4.5

Table 1. Clinical and molecular characteristics of 139 MRSA and MSSA isolates causing infection during a 4 year period

	Total	**MRSA**	**MSSA**	**OR 95 % CI**	***P* value**
	n=139 (%)	*n*=16 (%)	*n*=123(%)		
Gender (male)	77 (55.4)	11 (68.7)	66 (53.6)	1.9 (0.68–5.14)	0.29
Age median (range)	2.0y (1d- 17y)	2.0y (4d- 16y)	1.9y (1d- 17y)	N/A	0.56*
Length of stay (days); (range)	7.5 (1–70)	8.81 (3- 21)	7.9 (1–70)	N/A	0.87*
Admission to PICU	6 (4.3)	1 (6.2)	5 (4)	1.6 (0.12–13.40)	0.52
Period A Period B	60 (43.2) 79 (56.8)	11 (68.8) 5 (31.2)	49 (39.8) 74 (60.2)	1.0 0.3 (0.10- 0.92)	**0.03**
Manifestations					
SSTI	94 (67.7)	14 (87.5)	80 (65)	3.7 (0.91–17.19)	0.09
TMD	23 (16.5)	0 (0)	23 (18.7)	0.00 (0.00–1.13)	**0.16**
INV	22 (15.8)	2 (12.5)	20 (16.2)	0.73 (0.15–3.30)	>0.99
Infection type					
CA	102 (73.4)	14 (87.5)	88 (71.5)	2.78 (0.66–12.79)	0.23
COHA	17 (12.2)	0 (0)	17 (13.8)	0 (0–1.36)	0.21

HA	20 (14.4)	2 (12.5)	18 (14.6)	0.8 (0.17–3.82)	>0.99
Virulence genes *lukS/F*	13 (9.4)	5 (31.2)	8 (6.5)	6.53 (1.93–22.7)	**0.001**
eta	27 (19.4)	0 (0)	27 (21.9)	0.00 (0.00–0.91)	**0.03**
etb	6 (4.3)	0 (0)	6 (4.8)	0.00 (0.00–4.44)	0.36
tst	13 (9.4)	4 (25)	9 (7.3)	4.22 (1.26–14.6)	**0.04**
fnbA	125 (89.9)	13 (81.2)	112 (91)	0.42 (0.11–1.58)	0.22
fnbB	21 (15.1)	0 (0)	21 (17)	0.00 (0.00–1.28)	0.07

*Mann–Whitney *U* test was used to analyse differences between groups. PICU: Paediatric Intensive Care Unit; SSTIs: skin and soft tissue infections; TMD: toxin- mediated disease; INV: invasive disease; d: days; y: years; CA: community-a ssociated infections; COHA: community- onset healthcare- associated and HA: hospital- associated infections; Period A: 2015–2016, Period B: 2017–2018; N/A: not applicable

(Bio- Rad Laboratories). Representative isolates of the main PFGE types, including all MRSA and selected MSSA isolates, were further characterized by MLST to sequence types (STs), based on the online MLST database (https://pubmlst.org/organisms/ staphylococcus-aureus) [25, 26].

Statistical analysis

For categorical variables, chi-s quare or two- tailed Fisher's exact test were conducted to calculate *P* values and odds ratios. For continuous variables, statistical significance of observed associations was evaluated using Mann–Whitney U- test. Antibiotic susceptibility trends and MLST trends were analysed using chi-s quare for trend. The level of significance was set at *P* value<0.05. Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 9.1.0.

RESULTS

Clinical characteristics

During the 4 year study period, 139 non-d uplicated *S. aureus* isolates were collected from children and adolescents (77 boys, 62 girls) with invasive and non-i nvasive infections. Sixteen (11.5 %) isolates were MRSA and 123 (88.5 %) were MSSA. The mean age of patients was 3.8 years (median age; 2.02 years) and it did not differ between children with MSSA and those with MRSA (Table 1). *S. aureus* isolates were derived most frequently from skin and soft tissue infections (SSTIs; 94/139, 67.6 %), followed by toxin- mediated disease (TMD; 23/139,16.5 %, all 23 cases were SSSS) and invasive infections (INV; 22/139,15.8 %). Pneumonia (9/22), bacteraemia (4/22) and osteoarticular infections (6/22) were the most common invasive *S. aureus* infections. MRSA

Table 2. Clinical and molecular characteristics of community-a ssociated (CA), community-onset healthcare- associated (COHA) and hospital-associated (HA) *S. aureus* infections during a 4 year period

	CA	**HA/COHA**	**OR 95 % CI**	***P* value**
	n=102 (%)	*n*=37 (%)		
Gender (male)	61 (59.8)	16 (43.2)	1.95 (0.92–4.32)	0.08
Age median (range)	1.8y (4d- 16y)	2.2y (1d- 17y)	N/A	0.46*
Length of stay (days); (range)	7 (1–29)	11 (1–70)	N/A	**0.02***
Admission to PICU	3 (2.9)	3 (8.1)	0.34 (0.06- 1.78)	0.34

Period A	44 (43.1)	16 (43.2)	1.00 (0.47–2.14)	0.57
Period B	58 (56.9)	21 (56.8)	0.99 (0.46- 2.12)	0.57
Manifestations				
SSTI	73 (71.5)	21 (56.8)	1.91 (0.87- 4.18)	0.10
TMD	19 (18.6)	4 (10.8)	1.88 (0.59- 5.97)	0.31
INV	10 (9.8)	12 (32.4)	0.22 (0.08- 0.58)	**0.001**
Virulence genes *lukS/F*	9 (8.8)	4 (10.8)	0.79 (0.22–2.47)	0.72
eta	20 (19.6)	7 (18.9)	1.04 (0.40–2.65)	0.92
etb	4 (3.9)	2 (5.4)	0.71 (0.16–3.89)	0.70
tst	10 (9.8)	3 (8.1)	1.23 (0.32–4.36)	0.76
fnbA	92 (90.2)	33 (89.2)	1.11 (0.36–3.70)	0.86
fnbB	13 (12.7)	8 (21.6)	0.52 (0.20–1.42)	0.19

*Mann–Whitney *U* test was used to analyse differences between groups. d: days; y: years; CA: community-a ssociated infections; COHA: community- onset healthcare- associated and HA: hospital- associated infections; PICU: Paediatric Intensive Care Unit; SSTIs: skin and soft tissue infections; TMD: toxin- mediated disease; INV: invasive disease; Period A: 2015–2016, Period B: 2017–2018; N/A: not applicable.

isolates did not differ with regards to gender, length of stay, infection type, PICU admission as compared to MSSA (Table 1) and there was no associated mortality. All isolates recovered from children with TMD were MSSA.

Most isolates were classified as CA (102/139; 73.4 %) [18], while HA and COHA were less common (20/139;14.4 % and 17/139; 12.2 %, respectively). A total of 52 isolates belonged to children with comorbidities or prolonged hospital- stay, including neonates (38 isolates), children with cystic fibrosis (seven isolates), children admitted to PICU (six isolates) and one child with malignancy. HA and COHA-i solates were more commonly isolated from these children (OR 2.8, 95 % CI 1.27–5.78, p 0.01) and were more commonly associated with invasive disease (OR 4.41, 95 % CI 1.71–10.79, *P* 0.001).

Antibiotic resistance profiles

Of 139 *S. aureus* isolates, 93.5 % were resistant to penicillin, 35.9 % to fusidic acid, 7.2 % to mupirocin, 22.3 % to tobramycin, 18.7 % to erythromycin, 16.5 % to clindamycin and 9.3 % to tetracycline. Among 26 erythromycin-r esistant isolates, prevalence of constitutive ($cMLS_B$), inducible ($iMLS_B$) and MS resistance phenotypes was 53.9, 34.6 and 11.5 %, respectively. Resistance to clindamycin and tetracycline was higher among MRSA isolates (*P* 0.02 and *P* 0.001, respectively). MRSA and MSSA isolates did not differ regarding $cMLS_B$ and $iMLS_B$ resistance phenotype (OR 0.20, 95 % CI 0.03–1.39, *P* 0.16). Low resistance rates to gentamicin, ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, fosfomycin and trimethoprim/sulfamethoxazole were observed (2.1, 5, 5.5, 5.2, 3.3 and 3.6 % respectively). None of the *S. aureus* isolates were resistant to vancomycin, rifampicin, linezolid or teicoplanin. All phenotypically cefoxitin-r esistant isolates were also oxacillin-resistant, carrying *mecA* and were characterized as MRSA. Fusidic acid resistance was more common in isolates derived from SSTI and TMD infections (OR 7.2, 95 % CI 2.42–20.3, *P* 0.0002).

We did not observe significant differences in methicillin resistance among CA and HA isolates (OR 2.78, 95 % CI 0.66–12.79, *P* 0.17). CA- isolates were highly resistant to penicillin compared to healthcare- associated isolates (OR 75.2, 95 % CI 22.7–223.4, *P*<0.0001) and they did not differ regarding resistance to other antimicrobials. The clinical and molecular characteristics of CA compared to HA/COHA are shown in Table 2.

Table 3. Molecular characteristics of 58 *S. aureus* isolates characterized by MLST

No. of isolates	Pulso-type	ST	Methicillin-susceptible or resistant (*N*)	Origin (N)	*lukS/F (%)*	*Eta (%)*	*Etb (%)*	*Tst (%)*	*fnbA (%)*	*fnbB (%)*
40	1	ST121	MSSA (40)	CA (31) HA (4) COHA (5)	3 (7.5)	27 (67.5)	6 (15)	0 (0)	40 (100)	3 (7.5)
6	C	ST80	MRSA (5) MSSA (1)	CA (6)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (83.3)	0 (0)
4	B	ST239	MRSA (4)	CA (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	0 (0)
4	H	ST225	MRSA (3) MSSA (1)	CA (2) HA (1) COHA (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	4 (100)	0 (0)
4	A	ST30	MRSA (4)	CA (3) HA (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	3 (75)	0 (0)

Methicillin resistance declined significantly from 18.3 % in period A to 6.3 % in period B (p 0.03). A significant increase in fusidic acid and mupirocin resistance was observed (fusidic acid resistance x^2 test for trend, *P* 0.01; mupirocin resistance x^2 test for trend, *P*<0.0001). The rising trends of mupirocin resistance were associated with increasing rates of mupirocin resistance in MSSA isolates (*P*<0.0001). Resistance to clindamycin, tobramycin, erythromycin and levofloxacin also increased, though not significantly. We also observed a significant increase of SSSS overtime (x^2 test for trend, *P* 0.01).

Molecular characteristics

All 139 isolates were tested for virulence genes; 13 isolates (9.4 %) harboured *lukS/lukF- PV*, 27 (19.4 %) *eta*, six (4.3 %) *etb*, 13(9.4 %) *tst*, 125 (89.9 %) *fnbA* and 21 (15.1 %) *fnbB* genes. MRSA showed higher detection rates of *lukS/lukF- PV* and *tst genes* as compared to MSSA isolates and MSSA showed higher rates of *eta* gene carriage (Table 1). Detection rates of *eta* gene was also higher among isolates derived from TMD as compared to those causing INV/ SSTIs (OR 3.5, 95 % CI 1.36–9.29, *P* 0.01). No significant differences were found among CA/COHA/HA isolates with regards to virulence gene detection.

MSSA isolates showed polyclonality by PFGE and were classified into 20 pulsotypes including one to 40 strains each. However, two predominant pulsotypes were identified: type 1 with ten subtypes (ST121) including 40 strains and type 2 with seven subtypes and 16 strains. Sixteen PFGE types included one to eight MSSA strains each. Two additional MSSA were classified to PFGE types C (ST80) and H (ST225). MRSA belonged to four pulsotypes; type A: four strains (ST30), B: four strains (ST239), C: five strains (ST80) and H: three strains (ST225). Multilocus sequence typing identified five sequence types among the 58 tested isolates (Table 3, Fig. 1). All 23 isolates from children with SSSS were characterized by MLST. Pulsotype 1, ST121 was predominant (13/23, 56.5 %, *P* 0.002). Of 23 SSSS isolates, nine isolates (39.1 %) were shown to carry *eta* gene, three (13 %) carried *etb*, one isolate (4.3 %) carried both *eta and etb*. Isolates harbouring *eta* or *etb* genes all belonged to PFGE type1, ST121.

In our study, 40 isolates belonged to ST121, all of them were MSSA and CA in their majority (31/40, 77.5 %). As compared to other isolates, ST121 was highly resistant to fusidic acid (80 %), tobramycin (35 %), mupirocin (25 %) and clindamycin (25 %), rarely carried PVL and *tst* genes (3/40 and 0/40, respectively) but harboured epidermolysin genes (*eta* 27/40*; etb* 6/40; both *eta* and *etb* 4/40) and genes facilitating adherence to the epithelium (*fnbA* 40/40) and causing mainly SSTIs (26/40), SSSS (13/40) and one case of invasive disease. Compared to other pulsotypes, mupirocin resistance and presence of *eta/etb* genes was exclusively linked to pulsotype 1 (*P*<0.0001).

ST80 belonged to pulsotype C, was PVL- positive (100 %,6/6) and *mecA*-p ositive (83.30 %, 5/6), carried *fnbA* gene (83.3 %, 5/6), no epidermolysin genes and caused predominantly SSTIs (66.7 % 4/6). ST80 isolates were highly resistant to tetracycline (5/6,83.3 %) and fusidic acid (3/6,50 %). ST80 demonstrated a significant decline over the study period [period A: five isolates (8.3 %), period B: one isolate (1.2 %), *P* 0.08]. Antibiotic resistance did not differ significantly among ST121 and ST80 isolates, except for a statistically significant higher resistance to methicillin and tetracycline in ST80 isolates (ST121 vs ST80: methicillin, 0 % vs 83.3 %, *P*<0.0001; tetracycline, 5 % vs 83.3 %, *P*<0.0001).

DISCUSSION

This is the first study of antimicrobial resistance, clinical and molecular characteristics of *S. aureus* in hospitalized children and adolescents in the study area. We demonstrated the predominance of community- associated MSSA in hospitalized children with

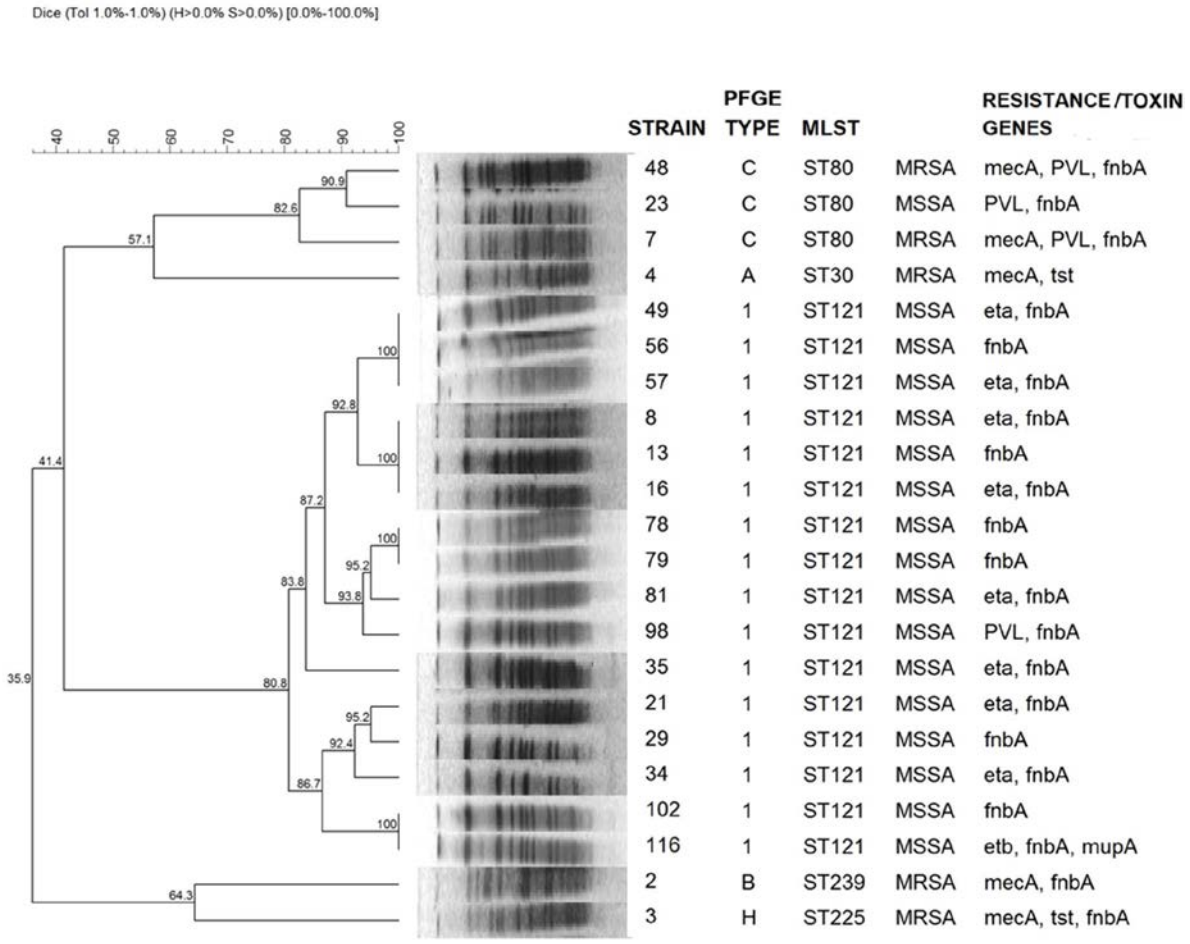


Fig. 1. Dendrogram of representative *S. aureus* isolates. CA isolates: numbers 48, 23, 7, 4, 49, 56, 57, 8, 13, 16, 78, 79, 81, 98, 35, 29, 34, 116, 2 and 3; HA isolates: number 21; COHA isolate: number 102.

invasive and non- invasive infections that has outweighed MRSA and manifested mainly with skin and soft tissue infections and staphylococcal scalded skin syndrome rather than with invasive disease.

In the past, Greece was described as a country with heavy burden of MRSA disease [27]. Published data between 2003 and 2015, reported high rates of CA- MRSA infections in children largely associated with the spread of a ST80- PVL positive MRSA clone [28–31]. In a 12 year, multicentre study published in 2014, MRSA was shown to be an important cause of both healthcare and community- associated infections in children [30], and in an 8 year study of CA-p neumonia in children published in 2016, MRSA accounted for over 75 % of cases [31]. In our patient population, only 11.5 % of isolates were MRSA with declining trends, consistent to reports of declining incidence of CA-M RSA disease [32]. MRSA isolates were characterized by higher clindamycin and tetracycline resistance rates as compared to MSSA and were more commonly *lukS/lukF- PV* positive and *tst* positive and less commonly for exfoliative toxin genes. The fact that the disease severity of MRSA infections was similar to MSSA infections in terms of length of stay, PICU admission and mortality suggests that multiple factors contribute to *S. aureus* pathogenesis and virulence, apart from antibiotic susceptibilities.

In our study, most *S. aureus* infections were characterized as community- associated while healthcare- associated infections were more common in hospitalized patients with underlying conditions or prolonged hospital stay, such as children with cystic fibrosis, with malignancies and neonates. Only few studies have directly compared community and healthcare-associated isolates in Greece [30]. We observed no difference among CA and healthcare-

associated isolates regarding methicillin- resistance, admission to PICU and virulence genes carriage. Consistent with previous reports, PVL was present in all CA-M RSA- ST80 isolates in our cohort and was rare in other isolates [28, 33].

We observed a threefold increase in the numbers of SSSS cases after 2017, consistent to globally reported increasing rates of SSSS [34, 35]. Children are known to be highly susceptible to *S. aureus* toxin-m ediated disease, which is attributed to their immune immaturity, reduced renal clearance of toxins and the common *S. aureus* carriage [7]. The epidermolytic activity of *S. aureus* isolates associated with SSSS has been linked to the activity of exfoliative toxins A and B [35]. In the present study, *S. aureus* isolates causing SSSS were MSSA, commonly resistant to fusidic acid and penicillin. They did not carry *tst* and *lukS/lukF- PV* genes but carried *fnbA* and epidermolysin genes. They belonged to eight pulsotypes by PFGE, and by MLST pulsotype ST121 was the most common. First described in infected adults in France in 2007 [36], ST121 has been identified in 10–30 % of isolates in Europe, United States of America, Africa and Asia [37–39]. In Greece, the emergence of a community- associated MSSA ST121 clone was reported in 2017, resistant to mupirocin and fusidic acid and carrying *eta/etb* genes encoding epidermolysins [34, 40]. In the present study, ST121 was identified in more than 32 % of MSSA isolates, was PVL-n egative and carried fibronectin-binding protein genes, mainly *fnbA*, *eta* and *etb* genes. MSSA- ST121 was more virulent than MRSA clones and was associated with fusidic acid, tobramycin and mupirocin resistance. Our results are consistent with previous studies reporting low rates of PVL genes in ST121 isolates and recognizing PVL- negative ST121 *S. aureus* as an emerging cause of severe morbidity [15, 37, 41].

The predominance of MSSA isolates is complex and host factors, virulence gene profile, antibiotic resistance and the ability to cope with environmental stress seem to play a role. In our study, all MRSA isolates were mupirocin susceptible, while MSSA demonstrated rising trends of mupirocin resistance. In addition, MSSA pulsotype 1, ST121 clone was characterized by significantly higher percentages of fusidic acid, mupirocin and tobramycin resistance. We speculate that the wide use of mupirocin as first- line decolonization therapy in this population and the indiscriminate use of fusidic acid and tobramycin may have given certain clones an advantage in niche survival.

Strengths of this prospective study were the analysis of all *S. aureus* isolates causing infection in hospitalized children and adolescents over a long period of time. Limitations of the study include that it represents a single-c entre cohort of hospitalized children. However, this represents the largest tertiary reference centre in the area and analogous data have not been previously published.

In conclusion, we showed that CA- MSSA has emerged as major cause of skin and soft tissue infections and staphylococcal scalded skin syndrome in children and adolescents. ST121 was the predominant clone causing SSSS and was highly resistant to fusidic acid and increasingly resistant to mupirocin. Awareness of this disseminating clone and its resistance patterns is essential and further characterization of its genetic background will improve the understanding of its unique characteristics.

Funding information

This work was supported by the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID) Small Grant 2017.

Author contributions

E.G. and I.S. contributed to the study design; M.T., N.G., S.M. and I.S. contributed to data collection and analysis. The first draft of the manuscript was written by M.T. and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

The study protocol was approved by the local Ethics Committee (approval number 17702). Informed consent was obtained from parents.

References

1. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:603–661.
2. Hultén KG, Mason EO, Lamberth LB, Forbes AR, Revell PA, *et al*. Analysis of invasive community-a cquired methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infections during a

period of declining community acquired methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infections at a large children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2018;37:235–241.

3. Crandall H, Kapusta A, Killpack J, Heyrend C, Nilsson K, *et al*. Clinical and molecular epidemiology of invasive *Staphylococcus aureus* infection in Utah children; continued dominance of MSSA over MRSA. *PLoS One* 2020;15:e0238991.
4. Gopal Rao G, Batura R, Nicholl R, Coogan F, Patel B, *et al*. Outbreak report of investigation and control of an outbreak of Panton- Valentine Leukocidin- positive methicillin- sensitive *Staphylococcus aureus* (PVL- MSSA) infection in neonates and mothers. *BMC Infect Dis* 2019;19:178.
5. Ismail H, Govender NP, Singh- Moodley A, van Schalkwyk E, Shuping L, *et al*. An outbreak of cutaneous abscesses caused by Panton- Valentine leukocidin- producing methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* among gold mine workers, South Africa, November 2017 to March 2018. *BMC Infect Dis* 2020;20:621.
6. Bartlett AH, Hulten KG. *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:860–861.
7. Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39:181–189.
8. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel*) 2010;2:1148–1165.
9. Handler MZ, Schwartz RA. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28:1418–1423.
10. Otto M. Basis of virulence in community- associated methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:143–162.
11. Josse J, Laurent F, Diot A. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: fibronectin-binding and other mechanisms. *Front Microbiol* 2017;8:2433.
12. Shinji H, Yosizawa Y, Tajima A, Iwase T, Sugimoto S, *et al*. Role of fibronectin- binding proteins A and B in *in vitro* cellular infections and *in vivo* septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2011;79:2215–2223.
13. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol* 2014;17:32–37.
14. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two- component and hetero-h eptameric pore- forming cytolytic toxins: structures, pore- forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:981–1003.
15. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, *et al*. Community- acquired methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton- Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9:978–984.
16. Sdougkos G, Chini V, Papanastasiou DA, Christodoulou G, Stamatakis E, *et al*. Community- associated *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage among children: molecular microbial data and clinical characteristics. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:995–1001.
17. Moschou A, Maraki S, Giormezis N, Moraitaki H, Stafylaki D, *et al*. Prevalence and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in four nursing home residents in Crete, Greece. *J Infect Chemother* 2020;26:199–204.
18. Maree CL, Daum RS, Boyle- Vavra S, Matayoshi K, Miller LG. Community- associated methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-a ssociated infections. *Emerg Infect Dis* 2007;13:236–242.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 28th informational supplement.Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. M100- S28*. 2018.
20. Boye K, Schønning K, Westh H, Lisby G. *Fast screening for MRSA by quadriplex real-time PCR*. Barcelona Spain, Poster Number: 1534, 2014.
21. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, *et al*. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either mecA or the new mecA homologue mecA(LGA251). *Clin Microbiol Infect* 2012;18:395–400.
22. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, *et al*. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun* 2002;70:631–641.
23. Gomes AR, Vinga S, Zavolan M, de Lencastre H. Analysis of the genetic variability of virulence-r elated loci in epidemic clones of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:366–379.

24. Miragaia M, Carriço JA, Thomas JC, Couto I, Enright MC, *et al*. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. *J Clin Microbiol* 2008;46:118–129.
25. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, *et al*. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–2239.
26. Thomas JC, Vargas MR, Miragaia M, Peacock SJ, Archer GL, *et al*. Improved multilocus sequence typing scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Microbiol* 2007;45:616–619.
27. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2012. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*. Stockholm: ECDC; 2013.
28. Niniou I, Vourli S, Lebessi E, Foustoukou M, Vatopoulos A, *et al*. Clinical and molecular epidemiology of community- acquired, methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infections in children in central Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:831–837.
29. Katopodis GD, Grivea IN, Tsantsaridou AJ, Pournaras S, Petinaki E, *et al*. Fusidic acid and clindamycin resistance in community-a ssociated, methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infections in children of Central Greece. *BMC Infect Dis* 2010;10:351.
30. Drougka E, Foka A, Liakopoulos A, Doudoulakakis A, Jelastopulu E, *et al*. A 12- year survey of methicillin-r esistant *Staphylococcus aureus* infections in Greece: ST80-I V epidemic? *Clin Microbiol Infect* 2014;20:796-803.
31. Doudoulakakis AG, Bouras D, Drougka E, Kazantzi M, Michos A, *et al*. Community-associated *Staphylococcus aureus* pneumonia among Greek children: epidemiology, molecular characteristics, treatment, and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:1177–1185.
32. Hultén KG, Mason EO, Lamberth LB, Forbes AR, Revell PA, *et al*. Analysis of invasive community-a cquired methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* infections during a period of declining community acquired methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infections at a large children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2018;37:235–241.
33. Mairi A, Touati A, Lavigne J- P. Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* ST80 clone: a systematic review. *Toxins (Basel*) 2020;12:E119.
34. Doudoulakakis A, Spiliopoulou I, Syridou G, Giormezis N, Militsopoulou M, *et al*. Emergence of staphylococcal scalded skin syndrome associated with a new toxinogenic, methicillin-s usceptible *Staphylococcus aureus* clone. *J Med Microbiol* 2019;68:48–51.
35. Hultén KG, Kok M, King KE, Lamberth LB, Kaplan SL. Increasing Numbers of Staphylococcal Scalded Skin Syndrome Cases Caused by ST121 in Houston, Texas. *Pediatr Infect Dis J* 2020;39:30–34.
36. Schefold JC, Esposito F, Storm C, Heuck D, Krüger A, *et al*. Therapy- refractory Panton Valentine Leukocidin-p ositive community- acquired methicillin- sensitive *Staphylococcus aureus* sepsis with progressive metastatic soft tissue infection: a case report. *J Med Case Rep* 2007;1:1752-1947.
37. Rao Q, Shang W, Hu X, Rao X. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone. *J Med Microbiol* 2015;64:1462–1473.
38. Conceição T, Aires- de- Sousa M, Pona N, Brito MJ, Barradas C, *et al*. High prevalence of ST121 in community-a ssociated methicillin- susceptible *Staphylococcus aureus* lineages responsible for skin and soft tissue infections in Portuguese children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:293–297.
39. Azarian T, Cella E, Baines SL, Shumaker MJ, Samel C, *et al*. Genomic epidemiology and global population structure of exfoliative toxin A- producing *Staphylococcus aureus* strains associated with staphylococcal scalded skin syndrome. *Front Microbiol* 2021;12:663831.
40. Doudoulakakis A, Spiliopoulou I, Spyridis N, Giormezis N, Kopsidas J, *et al*. Emergence of a *Staphylococcus aureus* clone resistant to mupirocin and fusidic acid carrying exotoxin genes and causing mainly skin infections. *J Clin Microbiol* 2017;55:2529–2537.
41. Togashi A, Aung MS, Yoto Y, Tsugawa T, Sueoka H, *et al*. Septic arthritis caused by an emerging ST121 methicillin- susceptible, PVL- negative *Staphylococcus aureus* harbouring a variant of bone sialoprotein- binding protein gene. *New Microbes New Infect* 2017;19:17–18.